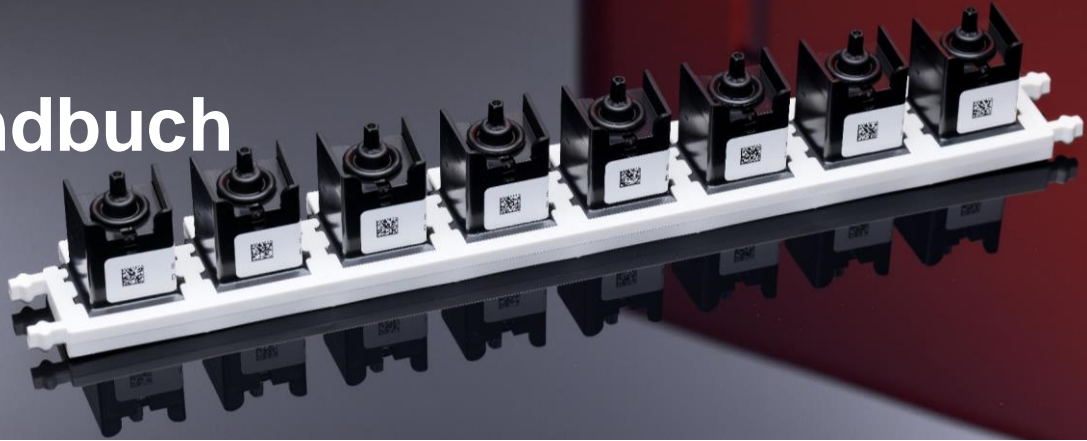


Handbuch



Pathogens xB_Handbuch_D_2023_11 14
© 2023 Cube Dx GmbH



November 2023.

| | | |
|------------------------------------|--------|----------------|
| IPC | REF / | 09120127730169 |
| | UDI-DI | |
| GINA 500 | REF / | 09120127730244 |
| | UDI-DI | |
| GINA 500 + DNA Purification | REF / | 09120127730145 |
| | UDI-DI | |

Kit zur Anreicherung von Bakterien- und Pilz-DNA aus humanem Blut (einschließlich DNA-Aufreinigung) inklusive interner Prozesskontrolle (IPC).

| | | |
|-------------|--------|----------------|
| LINA | REF / | 09120127730152 |
| | UDI-DI | |

Ein Modulationspuffer zur extraktionsfreien Testung von Bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Blutkulturen (BC).

| | | |
|--|--------|----------------|
| PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC | REF / | 09120127730084 |
| | UDI-DI | |
| | REF / | 09120127730107 |
| | UDI-DI | |
| | REF / | 09120127730091 |
| | UDI-DI | |
| | REF / | 09120127730114 |
| | UDI-DI | |
| hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB | REF / | 09120127730053 |
| | UDI-DI | |
| | REF / | 09120127730060 |
| | UDI-DI | |
| | REF / | 09120127730077 |
| | UDI-DI | |

Multiplexer DNA-Test zum Nachweis bakterieller 16S DNA und bakterieller Antibiotika-Resistenzgene mit Hinweis auf Homologien zu bekannten bakteriellen Typstämmen und zum Nachweis fungaler 28S DNA mit Hinweis auf Homologien zu bekannten fungalen Typstämmen aus humanen Proben.










Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 2 |
| 1. ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE | 3 |
| 2. EINLEITUNG UND ZWECKBESTIMMUNG | 4 |
| 3. TECHNISCHE BESCHREIBUNG | 10 |
| 4. BESTANDTEILE DES PRODUKTS | 12 |
| 5. LAGERUNG UND HALTBARKEIT | 14 |
| 6. BENÖTIGTES ZUBEHÖR | 15 |
| 7. TESTABLAUF | 16 |
| 8. RESULTATE | 24 |
| 9. ANALYTISCHE LEISTUNG | 31 |
| 10. KLINISCHE LEISTUNG | 34 |
| 11. MAßNAHMEN IM FALLE EINER ÄNDERUNG DER ANALYSELEISTUNG UND ENTSORGUNG | 36 |
| 12. TROUBLESHOOTING | 37 |



1. Erläuterung der Symbole

| Symbol | Erklärung |
|--|---|
|  | CE-Konformitätskennzeichnung. In-vitro-Diagnostikum. |
|  | Hersteller |
| EXP | Ablaufdatum |
| REF | Artikelnummer |
| SN | Seriennummer |
|  | Hinweis auf die Gebrauchsanweisung. |
|  | Einmalgebrauch. Nicht wiederverwenden. |
|  | Verwendbar bis ... |
|  | Temperaturbegrenzung für die Lagerung. |
|  | Ausreichend für <n> Tests. |
| CONTROL | Kontrollmaterial |
| H225 | Hochentzündliche Flüssigkeit und Dämpfe. |
| H301 | Giftig beim Verschlucken. |
| H315 | Verursacht Hautreizungen. |
| H318 | Verursacht schwere Augenschäden. |
| H319 | Verursacht schwere Augenreizungen. |
| H371 | Kann die Organe schädigen. |
| H412 | Schädlich für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. |
| P210 | Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Rauchverbot. |
| P233 | Behälter fest geschlossen halten. |
| P260 | Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. |
| P273 | Freisetzung in die Umwelt ist zu vermeiden. |
| P280 | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. |
| P301+P310 | BEI VERSCHLUCKEN: Sofort ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. |
| P305+P351+P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. |
| P337+P313 | Bei andauernder Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P370+P378 | Im Falle eines Feuers: Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöcher verwenden. |
| P403+P235 | In einem gut belüfteten Raum aufbewahren. Kühl aufbewahren. |
| P501 | Inhalt/Behälter in Übereinstimmung mit den lokalen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften der Entsorgung zuführen. |



2. Einleitung und Zweckbestimmung

Zweckbestimmung

Die in diesem Handbuch beschriebenen Produkte sind für den Nachweis (vorhanden/nicht vorhanden) und die Identifizierung (Arten, Gattungen) von Bakterien, Antibiotikaresistenzgenen und Pilzen in menschlichen Proben auf der Grundlage der Analyse kurzer DNA-Sequenzen des mikrobiellen Genoms konzipiert.

Die Produkte sind so ausgelegt, dass sie selbst sehr geringe Konzentrationen bakterieller und/oder fun- gularer DNA direkt aus Proben wie EDTA-Vollblut nachweisen. Infolgedessen ist für die Diagnose einer Infektion keine Kultivierung der Probe erforderlich und die Zeit bis zum Ergebnis wird im Vergleich zu herkömmlichen mikrobiologischen Kultivierungsmethoden erheblich verkürzt.

Die folgenden Proben - die unterschiedliche Probenbehandlungen erfordern (entweder das GINA- oder das LINA-Verfahren) - definieren unterschiedliche Verwendungszwecke:

1. EDTA-Proben (Vollblut): Beurteilung von Sepsis, Bakteriämie, Candidose.
2. Bronchoalveoläre Lavage (BAL): Beurteilung einer Lungenentzündung.
3. Positive Blutkulturen: Identifizierung von Bakterien und Pilzen in Blutkulturen.

Die Produkte sind nicht dazu bestimmt, Informationen über die Quantität der Mikroorganismen in der Probe zu liefern.

Die Tests dürfen nur von professionellen Anwendern in einer angemessenen Laborumgebung durchge- führt werden, die in der Anwendung der Produkte geschult wurden.

Allgemeine Informationen

Die Identifikation von Mikroorganismus beispielsweise direkt aus Vollblut ermöglicht eine frühzeitige gezielte anti- mikrobielle Therapie. Eine gezielte antimikrobielle Therapie ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Behand- lung der Infektion und die Begrenzung der oft schwerwiegenden Komplikationen und Nebenwirkungen, die letzt- lich zum Tod des Patienten führen können. Konventionelle Kultivierungsmethoden liefern unter Umständen keine frühzeitigen Ergebnisse, insbesondere wenn es sich bei dem verursachenden Mikroorganismus um ein an- spruchsvolles Bakterium (z. B. *Bordetella pertussis*) handelt, das besondere Wachstumsbedingungen benötigt, oder um ein langsam wachsendes Bakterium (z. B. *Helicobacter pylori*, das bis zu 7 Tage braucht, um in der Kultur zu wachsen) oder einen Pilz (z. B. *Candida glabrata*). Insbesondere in solchen Fällen kann die frühzeitige Identifizierung von Mikroorganismen durch Cube Dx für die Patienten von Vorteil sein.

Die Produkte sind jedoch für die komplementäre Verwendung mit der herkömmliche Blutkultur konzipiert. Sie sind keineswegs als Ersatz für die Blutkulturtechnik gedacht. Die Ergebnisse des direkten Bluttests sollten in Verbin- dung mit anderen relevanten klinischen und Laborbefunden interpretiert werden, um die Bereitstellung einer ge- zielten Therapie für Patienten mit Sepsis oder Pneumonie zu unterstützen.

Gelegentlich kann es zu widersprüchlichen Ergebnissen im Vergleich zur Blutkultur kommen: so kann der Test von Cube Dx ein negatives Ergebnis liefern, während das Ergebnis der Blutkultur positiv ist oder umgekehrt. Solche Diskrepanzen können auf eine geringe Anzahl von Mikroorganismen im Blut des Patienten zurückzuführen sein, da für den Test nur 0,5 ml Probenvolumen entnommen werden (im Vergleich zu 2x10 ml bei der Blutkultur). Ein weiterer Grund könnte das Auftreten seltener Typstämme sein, die bei der Testentwicklung nicht berücksich- tigt wurden. Es kann auch an den grundlegenden Unterschiede in den zugrunde liegenden Technologien für das Auslesen der Ergebnisse (genetische Informationen auf der Grundlage ausgewählter Typstämme im Vergleich zu Proteinmustern, die von MALDI-TOF verwendet werden) liegen.



Unterschiedliche Zeitpunkte der Probenentnahme können ebenfalls zu diskrepanten Ergebnissen führen. Es wird dringend empfohlen, die EDTA-Proben zur gleichen Zeit zu entnehmen wie die Blutkulturproben - wenn möglich noch vor der Verabreichung von Antibiotika.

Dieser Test ist wie in diesem Handbuch vorgeschlagen durchzuführen. Unterbrechungen des Workflows, z. B. durch Einfrieren des Eluats für einige Tage, können die Ergebnisse ebenfalls verändern.

IPC, GINA 500, GINA 500 + DNA Purification

Mit den GINA-Kits zur Pathogenanreicherung (und DNA-Aufreinigung) wird die große Mehrheit der menschlichen (Blut-)Zellen und Zelltrümmer aus Vollblut und anderen menschlichen Proben entfernt. Das Verfahren soll den Anteil der pathogenen (bakteriellen und pilzlichen) DNA intakter Mikroorganismen im Verhältnis zur menschlichen DNA in der resultierenden Lösung drastisch erhöhen und bessere Bedingungen für nachfolgende PCR-Reaktionen schaffen. Intakte Mikroorganismen sind solche, die noch lebensfähig (aktiv oder attenuiert (= in ihrem Wachstum z. B. durch Verabreichung bestimmter Antibiotika gehemmt)) sind. Im Gegensatz dazu werden geschädigte Mikroorganismen und freie DNA während des Prozesses entfernt. Der Test liefert Ergebnisse, die nicht von den Eigenschaften der verschiedenen Mikroorganismen abhängen.

Daher sind nur die Mikroorganismen, die dem Patienten noch Schaden zufügen können, für die Folgeprozesse relevant (für das *compact sequencing*). Einige antimikrobielle Medikamente zielen darauf ab, das Wachstum zu verhindern, neutralisieren die Mikroben aber nicht. In solchen Fällen werden die Mikroorganismen nicht beseitigt, da sie noch intakt sind. Diese Mikroorganismen stellen ein Risiko für den Patienten vor, sobald die antimikrobielle Behandlung beendet ist.

Das zweite fundamentale Feature der GINA-Pathogenanreicherung ist die hochwirksame und effiziente Lyse von Bakterien- und Pilzzellen (nach der Anreicherung).

Qualitätssicherungskonzepte für die hochsensitive molekulare Pathogenidentifikation aus humanen Proben stellen sicher, dass negative Ergebnisse auf negative Proben und nicht auf Fehler im Prozess zurückzuführen sind. Daher wird eine stringente Prozesskontrolle im gleichen Prozess durchlaufen wie die Probe selbst, ohne dabei die Sensitivität des Tests zu beeinflussen. Cube Dx' Interne Prozesskontrolle (IPC) besteht aus gefrorenem biologischem Material, das in der humanen Probe gelöst wird. Die IPC wird dem gleichen Extraktionsverfahren unterzogen wie die Probe selbst. Die anschließende PCR und der hybcell Test bestätigen die Präsenz der IPC-DNA und dadurch die Validität des Tests.

Der Test muss in einer für molekularbiologisches Arbeiten geeigneten Umgebung durchgeführt werden. Dies beinhaltet DNA- und DNase-freie Pipetten, getrennte Räume für die DNA-Isolierung und Amplifikation / Detektion sowie die Möglichkeit der UV-Dekontamination. **Der Test darf ausschließlich von qualifiziertem Personal, das in der Verwendung von Cube Dx' Produkten für die Identifikation von Pathogenen geschult wurde, durchgeführt werden.**

Zur Abarbeitung von GINA-Kits werden eine Tischzentrifuge mit einem Rotor für 2 mL Tubes (bis 11.000g; Eppendorf, Hermle, etc.) und ein herkömmlicher Heizblock (bis zu 100°C; Analytic Jena, Coyote Bioscience, etc.) benötigt.

Das Kit ist nicht für die anschließende quantitative Bestimmung von Erregern (im Sinne von koloniebildenden Einheiten) in der Probe vorgesehen.

LINA

Positive menschliche Blutkulturen und bronchoalveolären Lavagen (BAL) enthalten eine Fülle von Mikroorganismen. Die Identifizierung von Krankheitserregern und Antibiotikaresistenzgenen aus diesen Proben sollte einfach und schnell sein.

Der LINA-Transfer- und Modulationspuffer verkürzt die Zeit für die molekulare Identifizierung, da er die RNA/DNA-Extraktionsprozesse überflüssig macht und eine direkte PCR ermöglicht.



Zusammen mit den PCR-Produkten von Cube Dx (Bacteria, Fungi, Resistance) und den Erreger-Identifikationshybcells können Mikroorganismen und Resistenzgene in weniger als 2 Stunden aus solchen Proben bestimmt werden.

Das Verfahren muss in einer für molekularbiologische Tests geeigneten Umgebung durchgeführt werden. Dazu gehören DNA- und DNase-freie Pipetten, getrennte Räume für DNA-Isolierung und Amplifikation/Detektion sowie die Möglichkeit der UV-Dekontamination. **Der Test darf ausschließlich von qualifiziertem Personal durchgeführt werden, das in der Verwendung der Cube Dx Produkte zur Identifizierung von Krankheitserregern geschult wurde.**

Der Test ist nicht für die nachfolgende quantitative Bestimmung der in der Probe vorhandenen Krankheitserreger (in Form von koloniebildenden Einheiten) bestimmt.

PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB

Die *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistance* und *PCR-Box Fungi*, sowie die qualitativen Tests *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* sind in-vitro Tests für die Detektion und die Identifikation von Bakterien, Antibiotika-Resistenzen und Fungi basierend auf Homologien zu bakterieller 16S DNA, zu Resistenzgenen und fungaler 28S DNA aus humanen Proben. Die *PCR-Box IPC* amplifiziert DNA der IPC (Interne Prozesskontrolle) die zur EDTA-Probe hinzugegeben wird und mit *GINA 500* verarbeitet wird.

Der Test kann in Verbindung mit anderen klinischen Informationen therapeutische Entscheidungen bei Patienten mit Verdacht auf (schwere) bakterielle und/oder fungale Infektionen unterstützen.

Bakterien und Resistenzgene die mit *hybcell Bacteria DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* potenziell nachgewiesen werden:

■ Blutkultur
 ■ Sepsis
 ■ Pneumonie

| Genus | Spezies | Profil | | |
|-----------------|--|--------|--|--|
| Abiiothrophia | <i>Abiiothrophia defectiva</i> | | | |
| Acinetobacter | <i>Acinetobacter baumannii</i> | | | |
| | <i>Acinetobacter calcoaceticus complex</i> | | | |
| Actinobacillus | <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | | | |
| Anaerococcus | | | | |
| Bacterioides | <i>Bacterioides fragilis</i> | | | |
| Bordetella | <i>Bordetella pertussis</i> | | | |
| Borrelia | | | | |
| | <i>Borrelia burgdorferi</i> | | | |
| Brucella | | | | |
| Burkholderia | <i>Burkholderia cepacia complex</i> | | | |
| | <i>Burkholderia pseudomallei</i> | | | |
| Campylobacter | | | | |
| Citrobacter | <i>Citrobacter koseri</i> | | | |
| | <i>Citrobacter freundii complex</i> | | | |
| Corynebacterium | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | | | |
| | <i>Corynebacterium jeikeium</i> | | | |
| | <i>Corynebacterium ulcerans</i> | | | |
| Enterobacter | <i>Enterobacter cloacae</i> | | | |



| | | | | |
|-------------------|--|--|--|--|
| | <i>Enterobacter cloacae complex</i> | | | |
| Enterococcus | <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> | | | |
| Escherichia | <i>Escherichia coli</i> | | | |
| Finnegoldia | <i>Finnegoldia magna</i> | | | |
| Fusobacterium | <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> | | | |
| Granulicatella | <i>Granulicatella adiacens</i> | | | |
| Haemophilus | <i>Haemophilus haemolyticus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> | | | |
| Helicobacter | <i>Helicobacter pylori</i> | | | |
| Klebsiella | <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | |
| Legionella | <i>Legionella pneumophila</i> | | | |
| Listeria | | | | |
| Moraxella | <i>Moraxella catarrhalis</i> | | | |
| Morganella | <i>Morganella morganii</i> | | | |
| Neisseria | <i>Neisseria meningitidis</i> | | | |
| Pasteurella | <i>Pasteurella multocida</i> | | | |
| Prevotella | <i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella intermedia</i> | | | |
| Propionibacterium | <i>Propionibacterium acnes</i> | | | |
| Proteus | <i>Proteus mirabilis</i> | | | |
| Providencia | <i>Providencia stuartii</i> | | | |
| Pseudomonas | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas non-aeruginosa</i> | | | |
| Salmonella | <i>Salmonella enterica</i> | | | |
| Serratia | <i>Serratia marcescens</i> | | | |
| Staphylococcus | <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus non-aureus</i> | | | |
| Stenotrophomonas | <i>Stenotrophomonas maltophilia group</i> | | | |
| Streptococcus | <i>Streptococcus anginosus group</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis group</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus salivarius group</i> | | | |



| | | |
|----------|--|--|
| Yersinia | <i>Yersinia enterocolitica</i> | |
| | <i>Yersinia pseudotuberculosis complex</i> | |

| Gram | Resistenz | Resistenzgen | Profil |
|----------|------------------------------|----------------------------|--------|
| Positive | Vancomycin resistances | <i>vanA</i> <i>vanB</i> | |
| | Methicillin resistances | <i>mecA</i> <i>mecC</i> | |
| Negative | Betalactamase/ Carbapenemase | <i>CTX m1/m3</i> | |
| | | <i>IMP</i> | |
| | | <i>KPC</i> | |
| | | <i>NDM</i> <i>OXA48</i> | |

Fungi die mit *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* potenziell nachgewiesen werden:

| Genus | Spezies | Profil |
|----------------|---|--------|
| Aspergillus | <i>Aspergillus clavatus</i> | |
| | <i>Aspergillus flavus</i> | |
| | <i>Aspergillus fumigatus</i> | |
| | <i>Aspergillus niger</i> | |
| | <i>Aspergillus terreus</i> | |
| Candida | <i>Candida albicans</i> | |
| | <i>Candida dubliniensis</i> | |
| | <i>Candida parapsilosis</i> | |
| | <i>Candida tropicalis</i> | |
| Nakaseomyces | <i>Candida glabrata</i> | |
| Clavispora | <i>Candida auris</i> | |
| Cladosporium | | |
| Filobasidiella | <i>Cryptococcus neoformans</i> | |
| | <i>Cryptococcus gattii</i> | |
| Fusarium | <i>Fusarium oxysporum species complex</i> | |
| | <i>Fusarium solani species complex</i> | |
| Pichia | <i>Pichia kudriavzevii</i> | |
| Pneumocystis | <i>Pneumocystis jirovecii</i> | |
| | <i>Pneumocystis murina</i> | |
| Saccharomyces | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | |
| Scedosporium | | |



Der Test kann bei unterschiedlichen diagnostischen Aufgabenstellungen zum Einsatz kommen. Dabei sind nicht immer alle möglichen bakteriellen oder fungalen Spezies als Ergebnis auch klinisch relevant. Daher bietet der *hyborg* (Analyse-Instrument) die Möglichkeit, die Ausgabe von Resultaten durch die Definition von Profilen einzuschränken (indem einzelne Spezies oder Gattungen einfach in den Einstellungen des Profils abgewählt werden).

Der Test muss in für molekularbiologisches Arbeiten geeigneter Umgebung durchgeführt werden. Dies beinhaltet DNA- und DNase-freie Pipetten, getrennte Räumlichkeiten für DNA-Isolierung und Amplifikation / Detektion und die Möglichkeit der UV-Dekontamination.

Die Ausstattung umfasst einen Gefrierschrank (-15 bis -25°C) und eine DNA-Werkbank. Die Probenmaterialien sind DNA-haltige Lösungen, die mit einem geeigneten DNA-Extraktionsprodukt/-verfahren gewonnen wurden.

Zur Abarbeitung der *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistance*, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box IPC* ist entweder ein qPCR-Gerät (Rotor-Gene von Qiagen oder CFX96 von Biorad) oder ein Thermocycler (TPersonal von Analytic Jena) erforderlich.

Zur Abarbeitung von *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* ist ein *hyborg Dx RED2* Gerät (Cube Dx) erforderlich.

Die Testergebnisse sollten unter Berücksichtigung der Patientenakte sowie in Zusammenhang mit dem klinischen Status und anderen Befunden des Patienten ausgewertet werden.



3. Technische Beschreibung

Der Krankheitsverlauf bei einer Sepsis und vor allem die Heilungs- und Überlebenschancen des Patienten hängen von der frühzeitigen und schnellen Identifikation des / der verursachenden Erreger(s) ab.

Die Überlebens- und Erholungschancen bei Sepsis und anderen schweren Infektionen können mittels einer frühzeitigen Erkennung des / der verursachenden Erreger(s) und einer gezielten Behandlung erhöht werden.

IPC, GINA 500, GINA 500 + DNA Purification

Cube Dx' Interne Prozesskontrolle (IPC) besteht aus gefrorenem biologischem Material, das in der Probe gelöst wird. Dieses biologische Material ähnelt pathogenen Mikroorganismen, die eine Sepsis oder andere schwere Infektionen verursachen.

Das Kit *GINA 500 (für 500 µL Probenflüssigkeit mit oder ohne DNA-Reinigung)* ist für die klinische Routineanwendung zur Anreicherung pathogener (bakterieller, fungaler) DNA vorgesehen. Nach der Anreicherung wird die Lösung gereinigt und das Eluat kann in PCR-Reaktionen verwendet werden (z. B. bakterielle DNA, fungale DNA, Resistenzmarkergene). Für den Fall, dass PCR-Produkte in der Probe amplifiziert wurden, kann das jeweilige Pathogen direkt durch Cube Dx' *compact sequencing* identifiziert werden.

Der Test basiert auf folgenden Prozessschritten:

- Lyse und Entfernung menschlicher Zellen: Die Probe wird in die LE-Lösung gegeben und die Mehrheit menschlicher (und beschädigter Pathogen-)Zellen wird lysiert und durch Zentrifugation entfernt.
- Lyse von Pathogenzellen: NA-Lösung wird zugegeben und inkubiert. Verbleibende Pathogenzellen werden lysiert.
- Neutralisation: Das Lysat wird in die T-Lösung überführt, um den Lyse-Prozess zu stoppen und die resultierende Lösung zu neutralisieren.
- zugehörige DNA-Reinigung: Filtersäulchen werden für die Aufreinigung der DNA aus der GINA-Lösung verwendet.

Es besteht die Möglichkeit, dass das Ergebnis durch die Art der Probe oder Fehler während des Verfahrens (geringe Menge an DNA, Kontamination mit Umweltpathogenen / DNA), andere Einflüsse (abgebaute DNA, Kontamination mit Chemikalien) oder technische Fehler verfälscht werden.

Folgende Umstände können zu einem Verderben der Probe führen:

- die Zeit zwischen der (Blut-)Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung beträgt mehr als 4 Stunden;
- während der Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung wurde die Probe nicht entsprechend den Spezifikationen gelagert (korrekt: trocken und zwischen 4°C und 8°C lagern).

LINA

LINA ist ein gebrauchsfertiger Puffer, der in 8 mL Aliquote abgefüllt ist. Der Puffer verdünnt etwaige PCR-Inhibitoren in der Probe, so dass diese nicht mehr wirksam sind. Die Proben-Puffer-Mischung wird direkt in die PCR-Reaktionen überführt (ohne weiteren Extraktionsprozess). Durch das kurze und einfache Protokoll wird die Zeit bis zum Ergebnis drastisch verkürzt.

Das Ergebnis kann durch die Beschaffenheit der Probe oder durch Fehler während des Verfahrens (z. B. geringe Anzahl von Mikroorganismen in der Probe oder technische Fehler) verfälscht werden.

Folgende Umstände verschlechtern die Ergebnisse einer Probe:

- Höhere Probenmenge als gefordert (dies erhöht die Hemmstoffe).

Page 10 of 39



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Austria, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx develops and manufactures systems and tests for clinical diagnostics. Our protein and DNA-based tests aim to satisfy unmet medical needs and establish hybeoll technology as standard in multiplex diagnostics. This item is for CE-IVD use. This publication's information, descriptions, and specifications are subject to change without notice. Cube Dx GmbH shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with this material's furnishing, performance, or use.

PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB

Die Teste *hybcell Bacteria DNA xB*, *hybcell Fungi DNA xB* und *hybcell Pathogens DNA xB* und die dazugehörige PCR-Reaktionen – *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Resistance*, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box IPC* – sind für die klinische Routineanwendung vorgesehen. Die Ergebnisse dienen dem Nachweis sowie der Identifikation pathogener Bakterien, ihrer Resistenzgene und Fungi aus extrahierter DNA in Proben wie Vollblut oder positiven Blutkulturen und ergänzen etablierte Analyseverfahren wie z. B. die Kultivierung. *PCR-Box IPC* amplifiziert DNA der IPC (Internen Prozesskontrolle) um die Gültigkeit des Testablaufs durch eine positive IPC auf der *hybcell* zu bestätigen.

Vom Test profitieren insbesondere jene Patienten, die bereits eine Behandlung mit antimikrobiellen Mitteln erhalten haben (da die Kultivierung inhibiert sein könnte) oder Fälle, in denen die Erreger schwer zu kultivieren sind.

Der Test basiert auf folgenden Prozessschritten bzw. Testprinzipien:

- **Probenaufbereitung:** Siehe Pathogen Enrichment *GINA* (Cube Dx) für die Pathogenanreicherung mit *GINA 500* inklusive nachfolgender DNA-Aufreinigung und *LINA* Handbuch (Cube Dx).
- **Amplifikation von DNA – Detektion von Bakteriellen / Pilzlichen / Resistenzmarker Genen:** Isolierte DNA wird in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert – Zielregionen sind die 16S rDNA von Bakterien und entsprechende Resistenzgene, sowie die 28S rDNA von Fungi. Während der Amplifikation wird einer der DNA-Stränge mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Wird ein qPCR-Gerät verwendet, kann die Präsenz von Mikroorganismen in der Probe aus den Amplifikationskurven abgeleitet werden.
- **Identifikation:** Die qualitative Analyse erfolgt durch *compact sequencing*. Amplifikate binden an ihre komplementären, immobilisierten Primer, die im Falle einer perfekten Übereinstimmung (Primer Extension) durch eine hoch spezifische DNA-Polymerase verlängert werden. Unspezifische Amplifikate und nicht verlängerte Primer werden während stringenter Waschschriffe entfernt. Die spezifische Fluoreszenz wird vom *hyborg* (Gerät) gescannt und analysiert.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Testergebnisse durch die Probengewinnung (geringe Menge an DNA, Kontamination mit Umweltpathogenen / DNA) oder andere Einflüsse während der Präparation (zerstörte DNA, Kontamination mit Chemikalien), technische Fehler oder Fehler während der Amplifizierung oder Identifikation verfälscht werden. Besteht der Verdacht, dass eine Probe falsch oder fehlerhaft ist, sollten die Ergebnisse nicht berücksichtigt werden. Selbst wenn interne Kontrollen die meisten fehlerhaften Ergebnisse aufdecken, bleiben einige dieser Ergebnisse unerkannt.

Folgende Umstände können die Ergebnisse der Probe verschlechtern:

- Die Zeit zwischen der Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung beträgt mehr als 4 Stunden
- Während der Probennahme und dem Beginn der Probenaufbereitung wurde die Probe nicht entsprechend der Spezifikation gelagert (korrekt: trocken und zwischen 4°C und 8°C)



4. Bestandteile des Produkts

Internal Process Control (IPC):

- *IPC* (REF / UDI-DI 09120127730169): bei **-15 bis -25°C** lagern
 - 25 x 20 µL IPC
(25 x einzeln verpackte 0,5mL Microtubes mit biologischem Material (IPC, je 20µL))

Um Pathogene (Bakterien und Pilze) aus 500 µL (oder weniger) Probenflüssigkeit anzureichern sind folgende Produkte notwendig:

- *GINA 500* (REF / UDI-DI 09120127730244): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 2 x 25 *LE solution* (1400µL); (2 x 25 x 2mL Tubes mit gelber Verschlusskappe)
 - 1 x 12mL *NA solution* (rote Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 25mL *T solution* (grüne Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)

Um Pathogene (Bakterien und Pilze) aus 500 µL (oder weniger) Probenflüssigkeit anzureichern und die DNA aufzureinigen sind folgende Produkte notwendig:

- *GINA 500 + DNA Purification* (REF / UDI-DI 09120127730145): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 2 x 25 *LE solution* (1400µL); (2 x 25 x 2mL Tubes mit gelber Verschlusskappe)
 - 1 x 12mL *NA solution* (rote Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 25mL *T solution* (grüne Markierung auf Fläschchen und Verschlusskappe)
 - 1 x 30mL *Wash Buffer BW* (Fläschchen)
 - 1 x 60mL *Wash Buffer B5* (Fläschchen)
 - 1 x 13mL *Elution Buffer BE* (Fläschchen)
 - 50 x *Column*
 - 50 x *Collection Tube*
 - 50 x *Elution Tube*

Um Proben mit einem Überschuss an Mikroorganismen (positive Blutkulturen oder BAL) direkt zu testen sind folgende Produkte notwendig:

- *LINA* (REF / UDI-DI 09120127730152): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 50 x *LINA* (8mL)

Um Bakterien nachzuweisen sind folgende Produkte notwendig:

- *PCR-Box Bacteria* (REF / UDI-DI 09120127730084): bei **-15 bis -25°C** lagern
 - 12 x 20 µL PCR Master mixes Bacteria Rev.2
(12 x einzeln verpackte 0,2mL PCR Tubes mit PCR Mastermixes Bacteria (je 20µL))

Um Resistenzmarkergene nachzuweisen sind folgende Produkte notwendig:

- *PCR-Box Resistance* (REF / UDI-DI 09120127730107): bei **-15 bis -25°C** lagern
 - 12 x 20 µL PCR Master mixes Resistance Rev.2
(12 x einzeln verpackte 0,2mL PCR Tubes mit PCR Mastermixes Resistance (je 20µL))

Page 12 of 39



Cube Dx GmbH, Westbahnstraße 55, A-4300 St. Valentin / Austria, info@cubedx.com, www.cubedx.com

Cube Dx develops and manufactures systems and tests for clinical diagnostics. Our protein and DNA-based tests aim to satisfy unmet medical needs and establish hybeoll technology as standard in multiplex diagnostics. This item is for CE-IVD use. This publication's information, descriptions, and specifications are subject to change without notice. Cube Dx GmbH shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with this material's furnishing, performance, or use.

Um Fungi nachzuweisen sind folgende Produkte notwendig:

- *PCR-Box Fungi* (REF / UDI-DI 091201277300921): bei **-15 bis -25°C** lagern
 - 12 x 20 µL PCR Master mixes Fungi Rev.2
(12 x einzeln verpackte 0,2mL PCR Tubes mit PCR Mastermixes Fungi (je 20µL))

Um IPC DNA nachzuweisen sind folgende Produkte notwendig:

- *PCR-Box IPC* (REF / UDI-DI 09120127730114): bei **-15 bis -25°C** lagern
 - 12 x 20 µL PCR Master mixes IPC Rev.2
(12 x einzeln verpackte 0,2mL PCR Tubes mit PCR Mastermixes IPC (je 20µL))

Um Bakterien- und Resistenzmarker-Gene zu identifizieren sind folgende Produkte (zusätzlich zu dem generellen Buffern für den hyborg (Gerät)) notwendig:

- *hybcell Bacteria DNA xB Kit* (REF / UDI-DI 09120127730053): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 24 x hybcell Bacteria DNA xB Rev.2
(24 x einzeln verpackte hybcells Bacteria DNA xB)
 - 24 x Lid
 - 1x PPE-Additive (900µl)

Um Pilze zu identifizieren sind folgende Produkte (zusätzlich zu dem generellen Buffern für den hyborg (Gerät)) notwendig:

- *hybcell Fungi DNA xB Kit* (REF / UDI-DI 09120127730060): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 24 x hybcell Fungi DNA xB Rev.2
(24 x einzeln verpackte hybcells Fungi DNA xB)
 - 24 x Lid
 - 1x PPE-Additive (900µl)

Um Bakterien, Pilze und Resistenzmarkergene zu identifizieren sind folgende Produkte (zusätzlich zu dem generellen Buffern für den hyborg (Gerät)) notwendig:

- *hybcell Pathogens DNA xB Kit* (REF / UDI-DI 09120127730077): lagern bei **Raumtemperatur (8 bis 25°C)**
 - 24 x hybcell Pathogens DNA xB Rev.2
(24 x einzeln verpackte hybcells Pathogens DNA xB)
 - 24 x Lid
 - 1x PPE-Additive (900µl)

Es dürfen keine Komponenten unterschiedlicher Lots gemeinsam verwendet werden!



5. Lagerung und Haltbarkeit

Produkte

Die Mindesthaltbarkeit der Produkte ist nur garantiert, wenn die erforderlichen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen während des Transports und der Lagerung gewährleistet sind. Das Ablaufdatum der Produkte ist auf den Produktlabels angegeben.

- *GINA 500, GINA 500 + DNA Purification, LINA, hybcells (Bacteria DNA xB / Fungi DNA xB / Pathogens DNA xB)* und ihre *PPE-Additive* werden bei Raumtemperatur geliefert und müssen bei **8 bis 25°C** gelagert werden.
- *IPC, PCR-Box Bacteria, PCR-Box Resistance, PCR-Box Fungi und PCR-Box IPC* werden gefroren geliefert und müssen bei **-15 bis -25°C** gelagert werden.

Ist die Schutzverpackung der hybcell oder einer anderen Verpackung (z.B. Tubes) beschädigt oder das Mindesthaltbarkeitsdatum überschritten, darf das Produkt / die Komponente nicht verwendet werden. Die hybcells sind unmittelbar nach dem Öffnen der Schutzverpackung zu verwenden. Mehrmalige Gefrier-Auftau-Zyklen (> 2x) der PCR-Boxen sind zu vermeiden. Das Auftauen und wieder Einfrieren der IPC zerstört die IPC und ist daher zu vermeiden. Die IPC muss unmittelbar nach dem Öffnen des Tubes verwendet werden.

Proben

Blutproben

- Für optimale Ergebnisse kühl und trocken zwischen 4°C und 8°C für bis zu 4 Stunden lagern. Die Lagerung unter diesen Bedingungen ist bis zu 48 Stunden möglich.
- Blutproben keinesfalls einfrieren!

BAL

- Für optimale Ergebnisse kühl und trocken zwischen 4°C und 8°C für bis zu 4 Stunden lagern. Die Lagerung unter diesen Bedingungen ist bis zu 48 Stunden möglich.
- Vermeiden Sie wenn möglich das Einfrieren von BAL-Proben. Wenn es notwendig ist, frieren Sie die Proben bei -15°C bis -25°C ein.

Blutkultur

- Für optimale Ergebnisse kühl und trocken zwischen 4°C und 8°C für bis zu 48h lagern
- Lagerung bei -15°C bis -25°C möglich.



6. Benötigtes Zubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des Tests und die Reinigungsreaktion benötigt:

| Erforderliches Zubehör / erforderliche Infrastruktur | REF / GTIN | |
|---|--|---------------|
| Mini-Zentrifuge (Rotor für 0,2 mL) | <u>Thermo</u> ¹ : MySpin | |
| Mini Vortex Mixer | Fisher Scientific ² | |
| Gefrierschrank (- 20°C) | | |
| DNA-Werkbank | <u>Starlab (Beispiel)</u> ³ : Laminar Flow PCR Werkbank mit UV-Licht <u>PEQLAB (Beispiel)</u> ⁴ : PCR-Arbeitsstation | |
| Pipetten: ▪ 20 – 200 µL ▪ 100 – 1000 µL | <u>GILSON</u> ⁵ : PIPETMAN P200N PIPETMAN P1000N | |
| DNA-freie Filterspitzen: ▪ 200/300 µL ▪ 1000 µL | <u>PEQLAB</u> : 300 µL Biotix 1250 µL Biotix | |
| Standardtischzentrifuge (mit Rotor für 2 mL Tubes) | <u>Eppendorf</u> ⁶ : Centrifuge 5430 | |
| Standardheizblock | <u>Coyote Bioscience</u> ⁷ H2O3-H | |
| qPCR Gerät oder Thermocycler | <u>Qiagen</u> ⁸ : Rotor-Gene <u>Biorad</u> ⁹ : CFX96 <u>Thermo</u> ¹⁰ Quantstudio 3 / 5 <u>Analytic Jena</u> ¹¹ : TPersonal Thermocycler (Biometra) | |
| System Liquid | <u>Cube Dx</u> : 1L, ausreichend für 8 Wochen | 9120127730022 |
| PE-Buffer | <u>Cube Dx</u> : 1L, ausreichend für 96 hybcells | 9120127730138 |
| Hyborg | <u>Cube Dx</u> : hyborg Dx RED2 | 9120127730015 |

1 www.thermofisher.com/order/catalog/product/75004081

2 www.fishersci.com/shop/products/variable-speed-mini-vortex-mix/14955163

3 www.starlab.de

4 www.peqlab.de

5 www.gilson.com

6 www.eppendorf.com

7 www.coyotebio.com

8 www.qiagen.com

9 www.bio-rad.com

10 www.thermofisher.com

11 www.biometra.com



7. Testablauf

! Stellen Sie vor Beginn der Testung sicher, dass der hyborg betriebsbereit ist!

- Ist der hyborg eingeschaltet (prüfen Sie den Bildschirm des Geräts - für Details siehe hyborg Dx RED2 Gebrauchsanweisung)?
- Kontrollieren Sie, ob der hyborg mit ausreichend System Liquid und PE-Buffer ausgestattet ist. Wenn nicht, füllen Sie diese Flüssigkeiten nach.
- Entleeren Sie gegebenenfalls den Waste-Behälter (Position W).
- Prüfen Sie, ob das notwendige Protokoll verfügbar ist. Wenn nicht, laden Sie das Protokoll (für Details siehe hyborg Dx RED2 Gebrauchsanweisung).

Beachten Sie, dass einige Schritte des Verfahrens die Vorbereitung von Equipment oder Reagenzien erfordern. Da diese mit Wartezeiten verbunden sein können, lesen Sie vor der Durchführung das gesamte Kapitel des Ablaufs durch

Während der Verarbeitung der Proben müssen ein Labormantel, Latexhandschuhe, Ärmelschutz, ein Haar- (und Bart-) Netz und ein Mundschutz getragen werden, um eine Kontamination der Testreagenzien zu vermeiden. Die Anreicherung von Pathogenen (siehe Schritte 2. - 8. unten, in rot) muss mittels einer DNA-Laborbank erfolgen.

In den folgenden Abschnitten wird der Arbeitsablauf in 3 Schritte beschrieben;

1. Probenvorbereitung: mit GINA/LINA
2. Detektion: PCR/qPCR
3. Identifizierung: compact sequencing

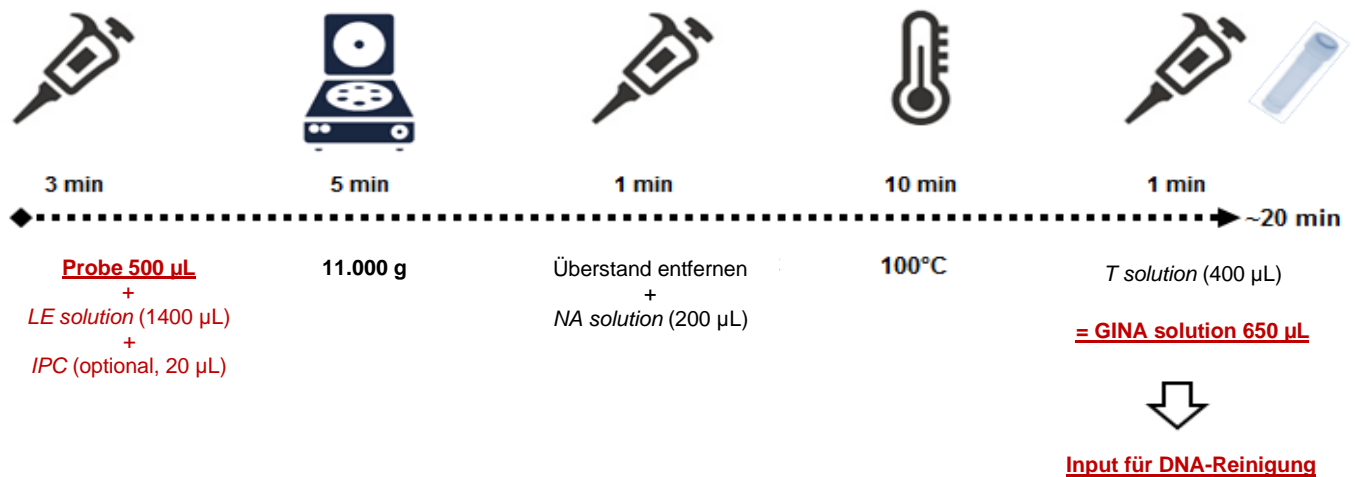


1 Probenvorbereitung: GINA/LINA

GINA: Anreicherungs- (und Reinigungs-) Verfahren

Vollblutproben können in K3E K3EDTA- oder K2E K2EDTA-Vakuettenröhrchen entnommen werden.

Das Verfahren beginnt mit einer nativen Probe von EDTA-Vollblut. Vortexen Sie die Probe vor Gebrauch! Wenn Sie IPC verwenden, pipettieren Sie zuerst 500 µl der Blutprobe in den IPC.



1. Stellen Sie sicher, dass alle Komponenten des Kits und das Equipment für die Verwendung bereitstehen. Die benötigten Röhrchen mit *LE solution*, *IPC* oder *EPC* kurz abzentrifugieren, um das Verschütten von möglicherweise in den Schraubkappen vorhandenen Flüssigkeiten beim Öffnen der Fläschchen zu vermeiden. Heizen Sie den Heizblock auf 100°C auf.
2. Bereiten Sie die *LE Solution* und die Probe vor. Transferieren Sie 500 µL (oder weniger) EDTA-Blut in die *LE solution* (gelbe Verschlusskappe) und pipettieren Sie auf und ab, um zu mischen. **Schütteln Sie die *LE solution Tube* (gelbe Kappe) nicht, um Schaumbildung zu vermeiden!**
3. Optional: Pipettieren Sie 500µl der Vollblutprobe in die IPC und pipettieren Sie das Gemisch anschließend in den LE Puffer.
4. Schließen Sie das Tube und markieren Sie es. Vortexen Sie für 5 Sekunden kräftig oder invertieren Sie das Tube mehrmals. Inkubieren Sie ca. 2 Minuten bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C).
5. Zentrifugieren Sie für 5 Minuten zwischen 9.000 und 11.000g (bevorzugt mit 11.000g). Falls verfügbar, bitte die „Soft Ramping“-Funktion der Zentrifuge verwenden.
6. Entfernen Sie den Flüssigkeitsüberstand vorsichtig durch Dekantieren und fügen Sie 200 µL der *NA solution* (rote Verschlusskappe) in das Röhrchen mit der gelben Verschlusskappe. Den Schraubverschluss fest schließen.
 - Hinweis: Etwas Probenflüssigkeit (~ 50µL) kann nach dem Dekantieren oben auf dem Pellet bleiben. **Vollblutproben sollten an dieser Stelle grünlich werden.**
7. Vortexen Sie 5 Sekunden lang kräftig. Stellen Sie sicher, dass das Tube noch fest verschlossen ist.
8. Inkubieren Sie bei 100°C für 10 Minuten (+/- 1 Minute) mit einem Heizblock.
9. Fügen Sie 400 µL der *T solution* (grüne Verschlusskappe) in das Röhrchen mit der gelben Verschlusskappe, um die Lösung zu neutralisieren.



- **Hinweis: Die Farbe der Vollblutproben sollten an dieser Stelle von grün zu dunkel-rötlich wechseln.**

10. Reinigen Sie die DNA unter Verwendung gängiger DNA-Extraktionsprodukte (im Falle von *GINA 500 + DNA purification*: Machery Nagel Nucleo Spin-Reagenzien sind im Kit enthalten. Andernfalls: folgen Sie den Anweisungen des Herstellers der DNA-Extraktionskits und überspringen Sie die Schritte 11 - 17).
11. Platzieren Sie für jede Probe eine Filtersäule (*Column*) in ein Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und markieren Sie dieses. Übertragen Sie die ganze GINA-Lösung (600 bis 650 µL) in die Filtersäule (*Column*). Entsorgen Sie das Tube mit dem gelben Verschluss.
12. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9.000 und 11.000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
13. Geben Sie 500 µL *Wash Buffer BW* zu und zentrifugieren Sie 1 Minute zwischen 9.000 und 11.000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
14. Fügen Sie 600 µL *Wash Buffer B5* hinzu und zentrifugieren Sie 1 Minute zwischen 9.000 und 11.000g. Entfernen Sie die Filtersäule (*Column*), dekantieren Sie die Flüssigkeit im Sammelröhrchen (*Collection Tube*) und setzen Sie die Filtersäule (*Column*) erneut ein.
15. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9.000 und 11.000g, um die Silica-Membran zu trocknen. Überprüfen Sie, ob Flüssigkeit am unteren Ende der Filtersäule verblieben ist. Wenn ja, diesen Schritt wiederholen.
16. Geben Sie die Filtersäule (*Column*) in ein Elutionsröhrchen (*Elution Tube*) und markieren Sie dieses. Geben Sie 150µL *Elution Buffer BE* zu. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Minute. Zentrifugieren Sie für 1 Minute zwischen 9.000 und 11.000g. Überprüfen Sie das Elutionsvolumen. Falls das Elutionsvolumen zu niedrig ist, den Zentrifugationsschritt wiederholen. Entsorgen Sie die Filtersäule (*Column*).
17. Öffnen Sie das Elutionsröhrchen (*Elution Tube*) und inkubieren Sie für 3 Minuten bei 100°C im Heizblock.
18. Die gesammelte Flüssigkeit mit der DNA (Eluat), kann für PCR-basierte Anwendungen verwendet oder bei -20°C für die spätere Verarbeitung gelagert werden. Vor der Verwendung muss das Eluat kräftig **gevortext** werden.

LINA: Modulationsverfahren

Das Verfahren beginnt entweder mit einer (positiven) Blutkultur oder einer BAL Probe.

Beachten Sie, dass einige Schritte des Verfahrens die Vorbereitung von Equipment oder Reagenzien erfordern. Da diese mit Wartezeiten verbunden sein können, lesen Sie vor der Durchführung das gesamte Kapitel des Ablaufs durch.

Während der Verarbeitung der Proben müssen ein Labormantel, Latexhandschuhe, Ärmelschutz, ein Haar- (und Bart-) Netz und ein Mundschutz getragen werden, um eine Kontamination der Testreagenzien zu vermeiden.

1. Stellen Sie sicher, dass alle Komponenten des Kits und das benötigte Equipment bereitstehen.
2. Optional: Pipettieren Sie 20 µl IPC (Inhalt einer Reaktion) in das LINA-Röhrchen.
3. Pipettieren Sie die Probe in das LINA Röhrchen:
 - (positive) Blutkulturen: 2 µL
 - BAL: 20 µL



Anmerkung:

Unterschiedliche Kliniken / Abteilung haben unterschiedliche Methoden zur Entnahme von BAL-Proben. Daher muss die Menge der verwendeten BAL unter Umständen angepasst werden. Zu große Volumina an BAL können jedoch zu einer Inhibition der PCR führen. Daher wird die Verwendung der IPC empfohlen, um eine Inhibition anzuzeigen.

4. Schließen Sie das Röhrchen und schütteln oder vortexen Sie gründlich.



2 Detektion: PCR/qPCR

PCR-Box Bacteria / Resistance / Fungi / IPC hybcell Bacteria / Fungi / Pathogens DNA xB

Beachten Sie, dass einige Schritte des Verfahrens die Vorbereitung von Equipment oder das Auftauen von Reagenzien erfordern. Da diese mit Wartezeiten verbunden sein können, lesen Sie vor der Durchführung das gesamte Kapitel des Ablaufs durch.

Während der Verarbeitung der Proben müssen ein Labormantel, Latexhandschuhe, Ärmelschutz, ein Haar- (und Bart-) Netz und ein Mundschutz getragen werden, um eine Kontamination der Testreagenzien zu vermeiden. Die Vorbereitung der PCR (siehe Schritt 2, in rot) muss unter einer DNA-Werkbank durchgeführt werden.

Der Testablauf beginnt mit der Lösung resultierend aus der GINA Pathogenanreicherung und DNA-Aufreinigung oder dem LINA-Modulationspuffer (z.B. mit positiver Blutkultur).

1. Stellen Sie sicher, dass alle Komponenten des Kits und das Equipment für die Verwendung bereitstehen.
2. (q)PCR Reaktion:
 - Programmieren Sie das qPCR-Gerät oder den PCR-Thermocycler und speichern Sie das Programm unter "Patho_1":

| | |
|-----|--|
| 1 | 95°C for 2:00 |
| ▶ 2 | 95°C for 0:10 |
| 3 | 56°C for 0:10 |
| 5 | 72°C for 0:30 |
| | +Plate Read |
| | Zurück zu Schritt 2, 44 weitere Zyklen |
| 6 | 75°C for 1:00 |
| 7 | Schmelzkurve 75°C to 95°C in increment of 0,3°C for 0:10 |
| | +Plate Read |
| 8 | 25°C halten |

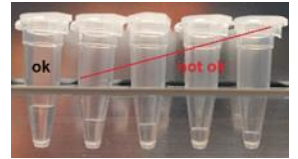
Fluorophor/Kanal: SYBR Green

Anmerkung:

Die Thermocycler der einzelnen PCR-/qPCR-Geräte können sich in ihrer thermischen Dynamik unterscheiden. Daher kann die geringfügige Anpassung der im Protokoll angegebenen Temperaturen oder Zeiten unter Umständen zu besseren Ergebnissen führen. Die Ergebnisse müssen nach einer Anpassung aber entsprechend validiert werden.



- Packen Sie die zu verwendenden 0,2 mL Tubes mit Mastermix Bacteria (roter Punkt), Mastermix Resistance (gelber Punkt), Mastermix Fungi (grüner Punkt) und Mastermix IPC (blauer Punkt) aus und tauen Sie diese auf. Homogenisieren (vortexen) und zentrifugieren Sie die Lösung in jeder Tube.
- Überprüfen Sie, ob das Volumen des PCR-Mixes ca. 20µl beträgt (siehe Bild, das linke Tube ist mit 20µl gefüllt). Verwenden Sie keine PCR-Mixe, die nicht richtig befüllt wurden.
- Fügen Sie 20 µL Proben-DNA-Lösung (oder 20 µL DNA-freies Wasser als NTC) zum PCR-Mastermix hinzu.
- Schließen Sie die PCR Tubes (wenn Sie keinen rotierenden Thermocycler verwenden, homogenisieren und zentrifugieren Sie die vorbereiteten Lösungen kurz, bevor Sie die PCR starten).
- Starten Sie das (q)PCR Programm „Patho_1“ (zuvor programmiert).



Die amplifizierte DNA kann entweder sofort für das compact sequencing weiterverwendet werden oder bei 4°C bis 8°C über Nacht oder bei -15°C bis -25°C für längere Zeit gelagert werden.



3 Identifizierung: compact sequencing

1. Stellen Sie sicher, dass der hyborg betriebsbereit ist.
2. Reißen Sie die Verpackung der hybcell an der Kerbe auf, entnehmen Sie die hybcell und schieben Sie diese in eine Position (A bis H) im Rack.
3. Kombinieren Sie maximal bis zu 3 der gewünschten Amplikons aus der gleichen Probe - z.B. jeweils 30µl der *PCR-Box Bacteria*, *PCR-Box Fungi* und *PCR-Box Resistance* - in einem der PCR-Tubes (z.B. *PCR-Box Bacteria*). Danach pipettieren Sie 30µl des PPE-Additivs (in der hybcell-Box) in das PCR-Tube mit der Amplikonmischung.

Achtung!

Die beste Leistung in Bezug auf den Signalhintergrund wird erreicht, wenn nur 1 oder 2 PCR-Amplikons in die hybcell eingebracht werden. Es können aber bis zu 3 PCR-Amplikons in die hybcell gebracht werden. Wenn alle 4 Amplikons verwendet werden, steigt das Risiko eines erhöhten Signalhintergrunds, was zu einer geringeren Spezifität und Sensitivität des Tests führen kann.

Beachten Sie, dass die Validität der Internal Process Control (IPC) bereits aus den PCR-Amplifikationskurven abgeleitet werden kann (vgl. Ergebnisse in Kapitel 9)

Verschiedene Beispiele für Amplikonkombinationen, die für das Laden der hybcell geeignet sind

| Ergebnisse der PCR | | | | Amplikons die in die hybcell übertragen werden |
|--------------------|-------|------------|------|--|
| Bacteria | Fungi | Resistance | IPC | |
| pos. | pos. | pos. | pos. | Bacteria + Fungi + Resistance |
| pos. | pos. | neg. | pos. | Bacteria + Fungi |
| pos. | neg. | pos. | pos. | Bacteria + Resistance |
| neg. | pos. | neg. | pos. | Fungi + IPC |

4. Pipettieren Sie auf und ab, um alle Bestandteile im Röhrchen zu mischen (**das Additiv enthält einen pH-Indikator; die Farbe der Lösung kann sich daher bei Einfüllen der Amplikons ändern. Dies hat keinen Einfluss auf die Leistung des Produkts**). Vermeiden Sie Luftblasen!
5. Pipettieren Sie das gesamte Volumen des PPE-Additivröhrchens (bis ca. 120 µL) auf einmal in die hybcell (durch den zentralen Kanal). Das endgültige Volumen ist abhängig von der Benutzung der entsprechenden PCR-Reaktionen und der Auswahl der positiven Amplikons nach der qPCR.

Verwenden Sie eine 200 µL Pipette mit zugehörigen Filterspitzen! Blockieren Sie dabei keinesfalls den hybcell Zentralkanal (Probenzufluss) mit der Pipettenspitze, während Sie die Amplikonmischung einbringen! Führen Sie die Spitze nur so tief wie nötig in den hybcell Zentralkanal ein und achten Sie auf einen lockeren Sitz.

6. Setzen Sie ein Lid auf die hybcell.





7. Starten Sie die Abarbeitung der Proben nach Verknüpfung der Probandaten mit der hybcell ID (für Details siehe hyborg Dx RED2 Gebrauchsanweisung). Beladen Sie das Gerät mit dem vorbereiteten Rack.

Setzen Sie das Rack korrekt ein (hybcell Barcodes / Labels müssen in das Innere des Geräts gerichtet sein)! Achten Sie darauf, dass sich alle hybcells an der korrekten Position befinden.



8. Resultate

PCR-Analyse

Die PCR-Ergebnisse entscheiden maßgeblich darüber, ob eine Probe als positiv oder negativ hinsichtlich Bakterien, Pilze, IPC-DNA oder Resistenzgene eingestuft wird. Ein positives PCR-Ergebnis leitet den Benutzer zum nächsten Schritt, der Identifizierung des Mikroorganismus durch die hybcell. Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass keine mikrobielle DNA nachgewiesen wurde und damit eine Identifizierung durch die hybcell nicht erforderlich ist.

Um zu bestimmen, ob ein Ergebnis positiv oder negativ ist, müssen sowohl die Amplifikationskurve als auch die Schmelzkurve analysiert werden. Alle PCR-Mixe verwenden den gleichen Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green.

Achtung!

Bitte beachten Sie, dass jedes PCR-Setup in seinen Eigenschaften leicht unterschiedlich ist und dass Ct-Werte und Schmelzpeaks von Gerät zu Gerät leicht variieren. Daher sind die unten angeführten Parameter Erfahrungswerte, wo die Schwellenwerte für Ct-Wert und Schmelztemperatur gesetzt werden sollten. Beide Kriterien müssen erfüllt sein, um ein PCR-Ergebnis als positiv zu definieren.

Jedes Labor muss diese Empfehlungen überprüfen und erforderlichenfalls seine eigenen Schwellenwerte anpassen. Das endgültige positive Ergebnis wird durch den hybcell-Test ermittelt. Daher sollten Sie alle Proben bei denen auch nur der geringste Zweifel eines negativen PCR-Ergebnisses besteht in Ihre hybcell-Läufe einbeziehen. Seien Sie insbesondere bei der Etablierung des Tests in Ihrem Labor und in der Anfangsphase seiner Anwendung großzügiger mit der Einbeziehung von Proben in die hybcell-Läufe.

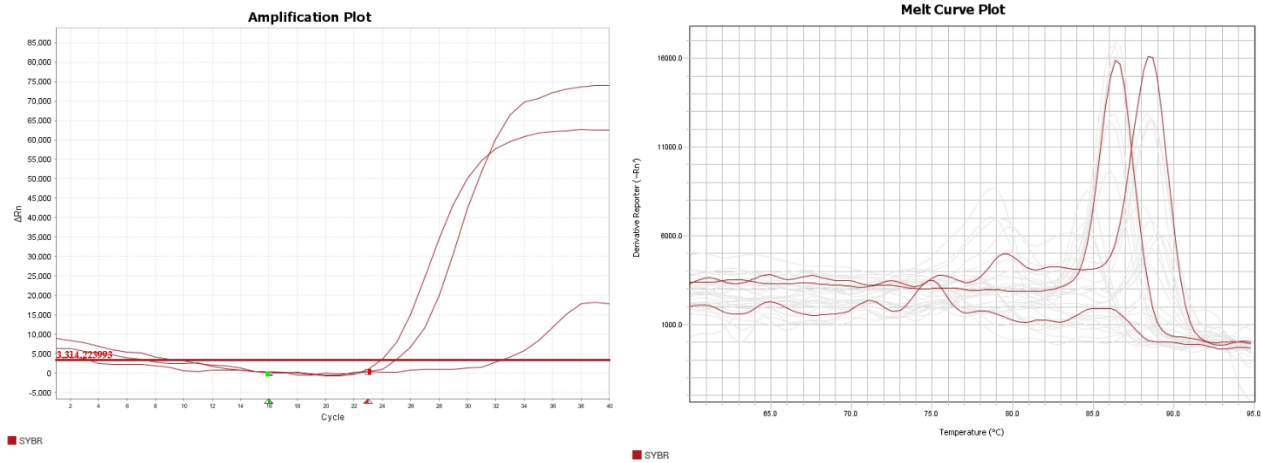
| | Ct-Wert | Schmelztemperatur |
|-------------------|---------|-------------------|
| Bacteria | < 34 | 80°C to 90°C |
| Fungi | < 40 | 80°C to 94°C |
| Resistance | < 34 | 80°C to 90°C |
| IPC | < 34 | 86°C ± 1°C |

Beachten Sie, dass die Schmelztemperatur von der konkreten Spezies oder dem Resistenzgen abhängig ist und daher für die pan-bakterielle, pan-fungale und Multiplex-Resistenzgen-PCR variiert.

Folgend ein Beispiel für eine Blutprobe die mit einer External Process Control (EPC) von *Candida albicans* und einer Internal Process Control (IPC) gespikt wurde.

| | Ct-Wert | Schmelztemperatur | Resultat |
|-----------------|---------|-------------------|----------------|
| Bacteria | 32.8 | 74.92°C | Negativ |
| Fungi | 25 | 88.54°C | Positiv |
| IPC | 24 | 86.51°C | Positiv |





Einige Gründe für Variationen bei Ct-Werten und Schmelztemperaturen:

- Der Schwellenwert für die Berechnung des Ct-Wertes wird vom Benutzer festgelegt
- Verschiedene PCR-Geräte bieten unterschiedliche Software mit unterschiedlichen Eigenschaften. Zum Beispiel Autoskalierung, Schwellenwerteinstellungen usw., die sich auf die Ct-Werte und die visuelle Darstellung der Kurven auswirken.
- Die PCR-Box Resistenzen besteht aus mehreren Primern (Resistenzgenen). Daher ist das Auftreten von Primer-Dimeren wahrscheinlicher als bei der Single-Plex-PCR für Bakterien oder Pilze.
- Bakterielle oder fungale Kontaminationen die während der Probenahme oder der Testdurchführung eingebracht werden, senken den Ct-Wert. Mögliche Ursachen für Kontaminationen sind in unserer Kurzanleitung "Pathogens xB_brief instructions Contamination Prevention Guide_24_10_2023" beschrieben. Hier erhalten Sie Informationen zur Probenentnahme, Probenaufbereitung, erforderlichen Schutzausrüstung, Flächendesinfektion, etc.
- Die Salzkonzentration und andere Bedingungen der Eluate können aufgrund von Abweichungen in der Zusammensetzung der Proben und der Verwendung verschiedener Probenentnahmeprodukte variieren.
- Schließlich kann der amplifizierte Mikroorganismus selbst den Ct-Wert (und noch mehr die Schmelztemperatur) beeinflussen.



Internal Process Control (IPC)

Die Internal Process Control (IPC) bestätigt die Gültigkeit von negativen Ergebnissen. Es handelt sich um eine positive Prozesskontrolle, die es dem Anwender ermöglicht, zwischen negativen Ergebnissen und ungültigen Ergebnissen zu unterscheiden - Ergebnisse, die höchstwahrscheinlich durch Fehler im Prozess beeinträchtigt wurden.

Die Gültigkeit der IPC wird entweder durch das PCR-Ergebnis (bei Verwendung von Realtime-PCR-Geräten, siehe oben) oder durch den hybcell-Test (siehe unten) bestätigt.

Die IPC und damit der Test ist gültig, wenn die unten angeführten Kriterien für die IPC-PCR erfüllt sind. In diesem Fall ist das Hinzufügen des Amplikons zum hybcell-Test nicht erforderlich (siehe oben, Begrenzung der PCR-Amplikons).

| | Ct-Wert | Schmelztemperatur |
|-----|---------|-------------------|
| IPC | < 34 | 86°C ± 1°C |

Achtung!

Die Internal Process Control (IPC) ist dazu gedacht, negative Ergebnisse zu bestätigen. Im Falle einer positiven Amplifikation des PCR-Mixes für Bakterien oder des PCR-Mixes für Pilze können die Amplifikationsergebnisse für die IPC ignoriert werden und der hybcell-Test sollte durchgeführt werden. Analog dazu kann das Ergebnis für IPC im Falle einer Identifizierung von Bakterien oder Pilzen mit hybcell ignoriert werden, wenn das IPC-Ergebnis des Tests "NOT DETECTED" lautet, wo es eigentlich "DETECTED" sein sollte.

hybcell-Kontrollen

Der Test ist mit mehreren internen Kontrollen ausgestattet, um die Validität der Ergebnisse sicherzustellen. Wenn die Kontrollen bestanden wurden, wird das Ergebnis im Bericht als ‚PASSED‘ angezeigt. Wenn eine oder mehrere Kontrollen fehlgeschlagen sind, werden die Kontrollen im Bericht als ‚FAILED‘ angezeigt. Wenn eine Kontrolle fehlschlägt, sind die Ergebnisse nicht valide und der Test muss wiederholt werden.

- **Process Control:** Überprüft die Abarbeitung der hybcell.
- **Surface Control:** Überprüft den hybcell-Typ, ausreichende Fluoreszenz und den Scanvorgang.
- **Background Noise Control:** Überprüft unspezifische Bindungen und grundlegende Funktionen der hyborg-Software.

Überprüfung der PCR-Mixe

Da die Verwendung der PCR-Boxen durch den Anwender variiert werden kann, werden die verwendeten PCR-Mixe durch Sonden auf der hybcell zur Anzeige gebracht. Wenn eine PCR-Box verwendet wird, dann wird im Ergebnis ‚ADDED‘ angezeigt, ansonsten ‚MISSING‘.

- **Bacteria PCR mix:** Prüft, ob die *PCR-Box Bacteria* verwendet wurde.
- **Fungi PCR mix:** Prüft, ob die *PCR-Box Fungi* verwendet wurde.

Testspezifische Kontrollen



Die Tests enthalten eine testspezifische Kontrolle. Wird die Kontrolle bestanden, ist das Ergebnis 'PASSED'. Andernfalls ist das Ergebnis 'FAILED'. Auch wenn der Test fehlschlägt, wird er analysiert und die Ergebnisse werden präsentiert. Diese Kontrollen helfen jedoch, die Plausibilität der Ergebnisse zu überprüfen.

- **Specificity Control:** Überprüft, ob beim Prozess des *compact sequencing* Probleme aufgetreten sind.
- **Internal Process Control**

Die Internal Process Control ist eine testspezifische Kontrolle, die bei jedem hybcell-Test untersucht wird. Aber nur wenn das (positive) PCR-Amplikon der IPC in die hybcell zugegeben wird und die entsprechenden Sonden auf der hybcell den Signalschwellenwert erreichen lautet das Ergebnis "DETECTED". Ansonsten - wenn entweder kein positives Amplikon hinzugefügt wird oder die Signalschwelle nicht überschritten wird - lautet das Ergebnis "NOT DETECTED".

Generelle Nomenklatur


- **Bacteria species** ist positiv, wenn die 16S rDNA einer Spezies amplifiziert wurde und die korrespondierende Primer Extension stattfand (z. B. *Staphylococcus aureus*).
- **Bacteria genus** ist positiv, wenn die 16S rDNA einer Spezies amplifiziert wurde und die Primer Extension einer Gattung (z. B. *Staphylococcus*) aber nicht einer spezifischen Spezies entspricht.
- **Bacteria pan** ist positiv, wenn amplifizierte bakterielle 16S rDNA vorhanden ist.
- **Fungal species** ist positiv, wenn die 28S rDNA einer Spezies amplifiziert wurde und die korrespondierende Primer Extension stattfand (z. B. *Candida albicans*).
- **Fungal genus** ist positiv, wenn die 28S rDNA einer Spezies amplifiziert wurde und die Primer Extension einer Gattung (z. B. *Candida*) aber nicht einer spezifischen Spezies entspricht.
- **Fungi pan** ist positiv, wenn amplifizierte fungale 28S rDNA vorhanden ist.









hyborg Reports

CubeDx GmbH
Westbahnstr. 55
4300 St. Valentin
Austria

cube dx
hybCell technology

Sample # 633248 BR **Test** hybcell Pathogen DNA xB (7) 
Date 06.10.2023 21:42 **Profile** -
Remark **hybcell** 2509A510038
Liquids

| Controls | |
|------------------|---------|
| Controls | PASSED |
| Bacteria PCR Mix | ADDED |
| Fungi PCR Mix | MISSING |

| Parameters | Result | Representation |
|--------------------------|----------|--|
| Specificity Control | PASSED | |
| Internal Process Control | DETECTED | |
| BACTERIA | | |
| Bacteria Pan | Positive | 50  10000 |
| Gram pos | Positive | 50  10000 |
| Staphylococcus sp. | Positive | 50  10000 |
| Staphylococcus aureus | Positive | 50  10000 |
| RESISTANCES | | |
| Methicillin | Positive | 50  10000 |
| Methicillin Type A | Positive | 50  10000 |

Negative Parameters

Abitrophia defectiva, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus complex, Actinobacillus pleuropneumoniae, Anaerococcus sp., Aspergillus clavatus, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Aspergillus terreus, Bacteroides fragilis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Borrelia sp., Brucella sp., Burkholderia cepacia complex, Burkholderia pseudomallei, Campylobacter sp., Candida albicans, Candida auris, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida sp., Candida tropicalis, Carbapenemases, Citrobacter freundii complex, Citrobacter koseri, Cladosporium, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium sp., Corynebacterium ulcerans, Cryptococcus gattii, Cryptococcus neoformans, CTX-m1/m3, Enterobacter cloacae, Enterobacter cloacae complex, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Extended Spectrum beta Lactamases, Finegoldia magna, Fungi Pan, Fusarium oxysporum species complex, Fusarium solani species complex, Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium sp., Gram neg, Granulicatella adiacens, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, IMP, Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, KPC, Legionella pneumophila, Listeria sp., Methicillin Type C, Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, NDM, Neisseria meningitidis, OXA-48, Pasteurella multocida, Pichia kudriavzevii, Pneumocystis jirovecii, Pneumocystis murina, Prevotella buccae, Prevotella intermedia, Propionibacterium acnes, Propionibacterium sp., Proteus mirabilis, Proteus sp., Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas non-aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces sp., Salmonella enterica, Scedosporium, Serratia marcescens, Staphylococcus non-aureus, Stenotrophomonas maltophilia group, Streptococcus agalactiae, Streptococcus anginosus group, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus gordonii, Streptococcus mitis group, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius group, Streptococcus sp., Vancomycin, Vancomycin Type A, Vancomycin Type B, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis complex

Ein Beispiel für einen PDF-Report für eine Probe mit positivem Ergebnis für Bakterien und die entsprechende Resistenz.



CubeDx GmbH
Westbahnstr. 55
4300 St. Valentin
Austria



Sample # 65181 F **Test** hybcell Pathogen DNA xB (7)

Date 06.10.2023 21:39 **Profile** -

Remark **hybcell** 2509A510038

Liquids

| Controls | |
|------------------|--------|
| Controls | PASSED |
| Bacteria PCR Mix | ADDED |
| Fungi PCR Mix | ADDED |

| Parameters | Result | Representation |
|--------------------------|----------|----------------|
| Specificity Control | PASSED | |
| Internal Process Control | DETECTED | |
| BACTERIA | | |
| Negative | | |
| RESISTANCES | | |
| Negative | | |
| FUNGI | | |
| Fungi Pan | Positive | 50 10000 |
| Pichia kudriavzevii | Positive | 50 10000 |

Negative Parameters

Abiotrophia defectiva, Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus complex, Actinobacillus pleuropneumoniae, Anaerococcus sp., Aspergillus clavatus, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Aspergillus terreus, Bacteria Pan, Bacteroides fragilis, Bordetella pertussis, Borrelia burgdorferi, Borrelia sp., Brucella sp., Burkholderia cepacia complex, Burkholderia pseudomallei, Campylobacter sp., Candida albicans, Candida auris, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida sp., Candida tropicalis, Carbapenemases, Citrobacter freundii complex, Citrobacter koseri, Cladosporium, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium jeikeium, Corynebacterium sp., Corynebacterium ulcerans, Cryptococcus gattii, Cryptococcus neoformans, CTX-m1/m3, Enterobacter cloacae, Enterobacter cloacae complex, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Extended Spectrum beta Lactamases, Finoglia magna, Fusarium oxysporum species complex, Fusarium solani species complex, Fusobacterium necrophorum, Fusobacterium nucleatum, Fusobacterium sp., Gram neg. Gram pos, Granulicatella adiacens, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, IMP, Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, KPC, Legionella pneumophila, Listeria sp., Methicillin, Methicillin Type A, Methicillin Type C, Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, NDM, Neisseria meningitidis, OXA-48, Pasteurella multocida, Pneumocystis jirovecii, Pneumocystis murina, Prevotella buccae, Prevotella intermedia, Propionibacterium acnes, Propionibacterium sp., Proteus mirabilis, Proteus sp., Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas non-aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces sp., Salmonella enterica, Scodosporium, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus, Staphylococcus non-aureus, Staphylococcus sp., Stenotrophomonas maltophilia group, Streptococcus agalactiae, Streptococcus anginosus group, Streptococcus dysgalactiae, Streptococcus gordonii, Streptococcus mitis group, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius group, Streptococcus sp., Vancomycin, Vancomycin Type A, Vancomycin Type B, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis complex

Ein Beispiel für einen PDF-Report für eine Probe mit positivem Ergebnis für Pilze.



Protokoll (.hyb)

Kalibrierungskurven und Mustererkennungen wurden für alle Mikroorganismen und Gene (identifizierte bakterielle 16S rDNA / Resistenzgene / identifizierte fungale 28S rDNA) durchgeführt und sind Teil des hyborg-Protokolls (XML-Datei mit der Erweiterung .hyb). Die Kalibrierung ist unabhängig vom hyborg Gerät (unit use). Der hyborg muss in seiner spezifizierten Arbeitsumgebung verwendet werden.

Vor der ersten Verwendung von hybcells eines neuen Lots muss ein für das entsprechende Lot geeignete Protokoll in das Gerät importiert werden. Aktuelle Protokolle werden auf der Cube Dx Homepage (Support-Bereich, passwortgeschützt) oder durch Ihren lokalen Händler zur Verfügung gestellt.

Parameter außerhalb des Profils

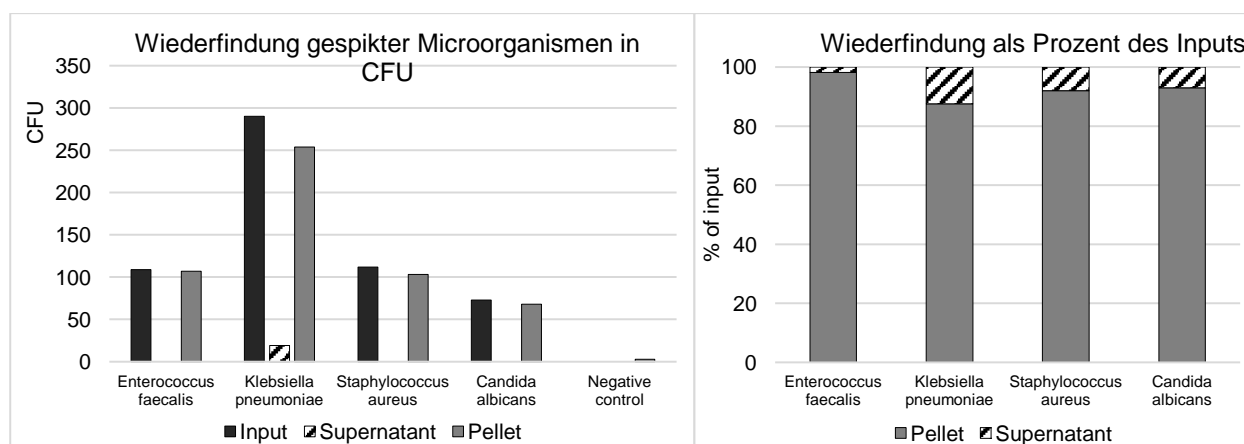
Gemäß der Zweckbestimmung werden klinisch relevante Ergebnisse angezeigt. Die Definition von klinisch relevanten Bakterien, Resistenzgenmarkern und Pilzen erfolgt innerhalb des Protokolls für die Charge (und ist für die CE-IVD-Testkits festgelegt). Positive Ergebnisse außerhalb dieser Definitionen werden als „Off-Profil-Parameter“ angezeigt. Solche Ergebnisse können von Spezialisten für Infektionskrankheiten interpretiert werden.



9. Analytische Leistung

IPC, GINA 500, GINA 500 + DNA Purification

Wiederfindungsrate von Pathogenen: EDTA-Vollblutproben von gesunden Probanden wurden entnommen und mit lebenden Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*) gespiked. Diese Proben wurden homogenisiert (gevortext). Leeres Wachstumsmedium wurde als negative Kontrolle verwendet. Der erste Schritt des *GINA 500*-Protokolls wurde ausgeführt (*LE solution* + Zentrifugation). Die resultierenden Pellets wurden in 100µL EDTA-Vollblut resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert. Nach der Zentrifugation wurden ebenfalls 100µL des Überstandes ausplattiert, um die Anzahl der lebenden Mikroorganismen zu bestimmen, die nicht im Pellet gebunden waren (= Verlust). Die Kolonien wurden nach 24 bis 48 Stunden Inkubation gezählt.



Die Wiederfindungsrate liegt zwischen 88% (*Klebsiella pneumoniae*) und 98% (*Enterococcus faecalis*).

Bakterien

Die **Nachweisgrenze** (limit of detection, LOD) wurde bestimmt, indem *Staphylococcus aureus*-, *Klebsiella pneumoniae*- und *Pseudomonas aeruginosa*- Kulturen verdünnt und mit dem Produkt *GINA 500 + DNA purification* verarbeitet wurden. Um die entsprechenden CFU zu bestimmen, wurden Aliquote der Verdünnungen ausplattiert und die Kolonien nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation gezählt.

Für alle drei Organismen lag die **LOD zwischen 10 und 20 CFU / mL**.

Die **Selektivität** (selectivity) wurde hauptsächlich mit referenzierten DNA-Proben von ATCC (American Type Culture Collection) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) getestet.

| | | | |
|------------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> c. | DSM30007 | <i>Actinobacter pleuropneumoniae</i> | DSM13472 |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | DSM4680 | <i>Burkholderia cepacia</i> complex | DSM7288 |
| <i>Brucella</i> sp. | DSM103976 | <i>Campylobacter jejunii</i> | DSM4688 |
| <i>Citrobacter freundii</i> compl. | DSM30039 | <i>Citrobacter koseri</i> | DSM4596 |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | ATCC 700971D-5 | <i>Corynebacterium jeikeium</i> | DSM7113 |
| <i>Corynebacterium ulcerans</i> | DSM46325 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | DSM30053 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> compl. | DSM30054 | <i>Enterococcus faecium</i> | DSM20477 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | DSM20478 | <i>Escherichia coli</i> | DSM30083 |
| <i>Finigoldia magna</i> | DSM20470 | <i>Fusobacterium necrophorum</i> | DSM20698 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | DSM15643 | <i>Haemophilus influenzae</i> | DSM4690 |
| <i>Helicobacter pylori</i> | DSM21031 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | DSM5175 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | DSM30104 | <i>Legionella pneumophila</i> | DSM25213 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | DSM15675 | <i>Moraxella catarrhalis</i> | DSM9143 |
| <i>Morganella morganii</i> | DSM30117 | <i>Neisseria meningitidis</i> | DSM10036 |



| | | | |
|-------------------------------------|----------|-------------------------------------|---------------|
| <i>Prevotella intermedia</i> | DSM20706 | <i>Propionibacterium granulosum</i> | ATCC 25746D-5 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | DSM4479 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | DSM50070 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | DSM50274 | <i>Salmonella enterica</i> | DSM554 |
| <i>Serratia marcescens</i> | DSM30121 | <i>Staphylococcus aureus</i> | DSM20774 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | DSM20044 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | DSM20263 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | DSM21257 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | DSM2134 |
| <i>Streptococcus anginosus gr.</i> | DSM20563 | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | DSM20662 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | DSM20566 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | DSM20565 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | DSM11067 | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | DSM8992 |

Für jedes Experiment wurde DNA von zwei unterschiedlichen Spezies zusammengemischt und getestet.

Jede getestete bakterielle DNA **zeigte das erwartete Ergebnis** auf dem hybcell Bericht.

Es konnten **keine unspezifischen Ergebnisse oder Kreuz-Reaktivitäten** beobachtet werden.

Die **Wiederholbarkeit** (repeatability) wurde durch mehrfache Amplifikation verschiedener Verdünnungen von *Staphylococcus aureus* bestimmt.

- **PCR-Box Bacteria**, kalkulierter CV bei einem mittleren Cq-Wert von 23,4: CV = 1,3 %.

Fungi

Die **Nachweisgrenze** (limit of detection, LOD) wurde bestimmt, indem *Candida albicans*- Kulturen verdünnt und mit dem Produkt und *Protokoll GINA 500 + DNA purification* verarbeitet wurden. Um die entsprechenden CFU zu bestimmen, wurden Aliquote der Verdünnungen ausplattiert und die Kolonien nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation gezählt.

Die **LOD beträgt ~ 2 CFU / mL**.

Die **Selektivität** (selectivity) wurde hauptsächlich mit referenzierten DNA-Proben von ATCC (American Type Culture Collection) und DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) getestet:

| | | | |
|---------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|
| <i>Aspergillus clavatus</i> | ATCC 1007D-2 | <i>Aspergillus flavus</i> | ATCC (strain?) |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | ATCC 1022 | <i>Aspergillus niger</i> | DSM1957 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 11006 | <i>Candida dubliniensis</i> | DSM28723 |
| <i>Candida glabrata</i> | ATCC (strain?) | <i>Candida parapsilosis</i> | ATCC 22019D-5 |
| <i>Candida tropicalis</i> | ATCC MYA-3404D-5 | <i>Cladosporium sp.</i> | DSM19653 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | ATCC MAY-565 | <i>Pichia kudriavzevii</i> | ATCC (strain?) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Molzym P1 | | |

Für jedes Experiment wurde DNA einer Bakterienspezies und einer Pilzspezies gemischt und getestet.

Jede getestete fungale DNA zeigte **das erwartete Ergebnis** auf dem hybcell Bericht.

Folgende unspezifische Ergebnisse konnten beobachtet werden:

Die Testung von ***Aspergillus clavatus*** zeigte positive Ergebnisse für: ***Aspergillus clavatus* + *Aspergillus fumigatus***.

Die **Wiederholbarkeit** (repeatability) wurde durch mehrfache Amplifikation verschiedener Verdünnungen von *Candida albicans* DNA bestimmt.

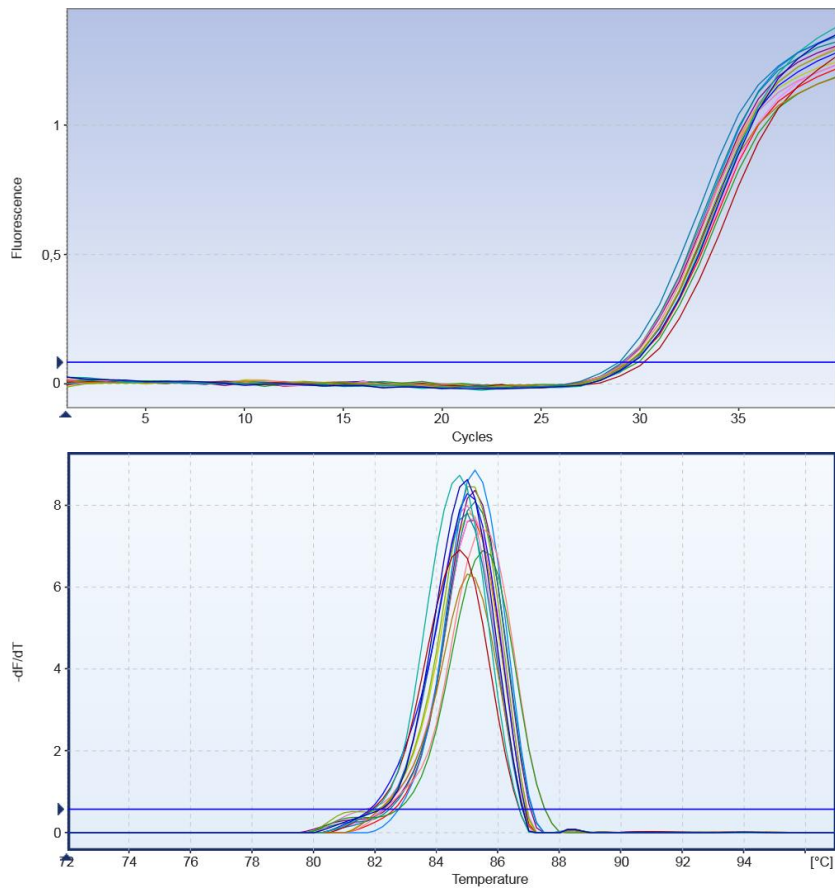
- **PCR-Box Fungi**, kalkulierter CV bei einem mittleren Cq-Wert von 35,4: CV = 2,4 %.

IPC

Die **Wiederholbarkeit** wurde mit 16 verschiedenen EDTA-Vollblutproben getestet: IPC (20 µL) wurde zugegeben und die Proben wurden gemäß dem *GINA 500*-Protokoll (einschließlich DNA-Aufreinigung) abgearbeitet. Die IPC-



qPCR (siehe Abbildung unten) wurde durchgeführt und die Ergebnisse wurden durch *hybcell Pathogens DNA xB* sowie die Sequenzierung der PCR-Produkte (Sanger) verifiziert.



Die Analyse der Quantifizierungszyklen (Cq) ergab (alle Werte gerundet):

Durchschnitt: Cq 29,6

Standardabweichung: +/- 0,3

Variationskoeffizient (CV): 1,1%

Der **Schwellenwert für die Cq** der IPC ist auf **29 +/- 2** (28 bis 32) eingestellt.



10. Klinische Leistung

GINA – Vollblut

Das Ergebnis der klinischen Leistungsuntersuchung wurde bei der ECCMID 2021 (01833 SMARTDIAGNOS – next-generation molecular sepsis diagnosis) präsentiert:

Resultat

Insgesamt wurden 352 Proben mit GINA und compact sequencing getestet sowie mit Blutkulturen mit MALDI-TOF-Identifizierung oder klinischer Bewertung verglichen. Die Sensitivität betrug 74 % und die Spezifität 98 %. Insgesamt wurden 96 % der Proben vom GINA- und compact sequencing-system korrekt klassifiziert. Das System weist gute Leistungen beim direkten Nachweis von Krankheitserregern im Blut auf und deckt mindestens 80-85 % der Mikroorganismen ab, die schwere Infektionen in Europa verursachen. Das System ist mit einer Reaktionszeit von 3-4 Stunden für eine einzelne Probe einfach zu bedienen.

| | | Blutkultur | | Genauigkeit | Sensibilität | Spezifität |
|-------|---------|------------|---------|-------------|--------------|------------|
| | | Positiv | Negativ | | | |
| LAB | Positiv | 28 | 5 | 96% | 74% | 98% |
| | Negativ | 10 | 309 | | | |
| Total | | 352 | | | | |

LINA – (positive) Blutkultur

Das Ergebnis der klinischen Leistungsuntersuchung wurde bei der ECCMID 2020 (Abstract 6917 – Molecular pathogen identification and resistance gene detection from positive blood culture) präsentiert:

Resultat

Insgesamt wurden 277 Proben mit LINA und *compact sequencing* getestet und mit Blutkulturen mit MALDI-TOF-Identifizierung oder klinischer Bewertung verglichen. Die Ergebnisse für positive Proben von Blutkulturen (BC) konnten mit *LINA compact sequencing* innerhalb von 3 Stunden ermittelt werden. *LINA* detektierte die positiven BC im Vergleich mit den Referenz-Methoden mit einer Sensitivität (sensitivity) von 98%. Zusätzlich konnten einige gemischte Infektionen und Bakterien mit langsamem (geschwächtem) Wachstum nachgewiesen werden, welche bei der Referenz-Methode (Massenspektrometrie) übersehen wurden. Darunter unter anderem *Acinetobacter sp.*, welche relevante Träger von Antibiotikaresistenzgenen sind. Die Spezifität (specificity) erreichte 88% für die Detektion in Blutkulturen.



| | | Blutkultur | | Genauigkeit | Sensibilität | Spezifität |
|---------|---------|------------|---------|-------------|--------------|------------|
| | | Positiv | Negativ | | | |
| Cube Dx | Positiv | 166 | 13 | 94% | 98% | 88% |
| | Negativ | 4 | 94 | | | |
| Total | | 277 | | | | |

LINA – BAL

Die Leistungsuntersuchung wurde in Kooperation mit einem deutschen Universitätskrankenhaus durchgeführt (unveröffentlicht).

Resultat

BAL-Proben von 79 Patienten (Institute for Medical Microbiology, University Hospital Essen / Germany) wurden mittels etablierten Blutkultur-Methoden, dem Unyvero System und Cube Dx's *compact sequencing* Technologie analysiert. Übereinstimmende Ergebnisse von mindestens zwei von drei Referenz-Methoden wurden als „richtig“ angenommen. Bei einer Probe konnte keine Übereinstimmung zwischen zwei der drei Methoden erzielt werden, deshalb wurde diese Probe ausgeschlossen. Für 31 Proben wurde das Ergebnis korrekterweise als positive klassifiziert, für 32 Proben korrekt als negativ. Von insgesamt 9 falsch-positiven Ergebnissen zeigten 5 *Haemophilus influenzae*. Von 6 falsch-negativen Resultaten zeigten nur 3 keinen *Staphylococcus aureus* an.

| | | Blutkultur | | Genauigkeit | Sensibilität | Spezifität |
|---------|---------|------------|---------|-------------|--------------|------------|
| | | Positiv | Negativ | | | |
| Cube Dx | Positiv | 31 | 9 | 81% | 84% | 78% |
| | Negativ | 6 | 32 | | | |
| Total | | 78 | | | | |



11. Maßnahmen im Falle einer Änderung der Analyseleistung und Entsorgung

Maßnahmen im Falle einer Änderung der Analyseleistung

Zur Verifizierung der Funktionalität des Tests ist eine wöchentliche Prüfung mit einem Referenzstandard (z. B. Cube Dx's externe Prozesskontrollen (EPCs)) empfohlen. Eine monatliche Funktionsprüfung ist verpflichtend.

Für die Verifizierung der Funktionalität der EPCs müssen mehrere Tests durchgeführt und mit dem Erwarteten Ergebnissen verglichen werden. Sind die Ergebnisse nicht wie erwartet, verwenden Sie EPCs eines anderen Lots und wiederholen Sie den Prozess.

Lassen Sie außerdem einmal im Monat eine Control hybcell laufen, um die grundlegenden Funktionen des hyborg Dx RED2 zu kontrollieren. Diese sind der Flüssigkeitstransport, die Optik und das Scannen, die Temperaturkontrolle und die Handhabung der hybcell.

Wenn Sie an der analytischen Leistung zweifeln, führen Sie einige zusätzliche Tests mit Kontrollmaterial durch (= gut beschriebenes Material, z. B. Cube Dx' EPCs), um die analytische Leistung zu bestätigen.

Beachten Sie bei Veränderungen der Analyseleistung auch den Punkt **Troubleshooting** (unten).

Für den Fall, dass die Probleme nicht behoben werden können, so ist unverzüglich Cube Dx Support oder ein zuständiger Vertriebspartner zu kontaktieren.

Entsorgung

Alle verwendeten Einmalartikel (PCR Tubes, hybcells etc.) können im Hausmüll entsorgt werden. Es muss auf die übliche Sorgfalt beim Umgang mit potenziell infektiösem Material geachtet werden.

Patientenprobenbehältnisse (z. B. EDTA-Röhrchen) und LE-Lösungsröhrchen (*GINA 500* Kit, gelbe Verschlusskappe) enthalten potenziell infektiöses Material und müssen entsprechend den Vorschriften Ihrer Organisation zur Entsorgung von infektiösem Material entsorgt werden.



12. Troubleshooting

Probenvorbereitung

| Problem | Mögliche Ursache | Maßnahmen |
|---------------------|--|---|
| Verlust des Pellets | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pellett wurde mit der Pipette aufgesogen | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Beginnen Sie mit dem Dekantieren des Überstands und pipettieren Sie anschließend die restliche Lösung ab. ▪ Wiederholen Sie den Extraktionsschritt |
| Kontamination | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Kontamination bei der Probenvorbereitung | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwenden Sie die empfohlene Schutzausrüstung ▪ Oberflächen mit 1%igem Hypochlorit und anschließend mit 80%igem EtOH reinigen |

PCR-Nachweis

| Problem | Mögliche Ursache | Maßnahmen |
|--|---|--|
| Ungewöhnlich aussehende Amplifikationskurven | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verteilung des Eluats im PCR-Gefäß ▪ Ungleichmäßige Verteilung der Proben-PCR-Lösung ▪ Blasen auf dem Boden des PCR-Gefäßes | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Zentrifugieren Sie die PCR-Gefäße kurz ab, bevor Sie sie in den Thermocycler überführen. |
| PCR-Inhibition | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verdünnung der PCR-Mischung ▪ Verwendung zu hoher Probenvolumina, insbesondere bei BAL-Proben ▪ Ethanol Rückstände im Eluat | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwenden Sie die empfohlene Eluat Menge für die PCR-Reaktion. ▪ Verwenden Sie eine Verdünnungsreihe, wenn Sie nicht sicher sind, welches Volumen an BAL geeignet ist. ▪ Überprüfen Sie die Elutionssäule auf EtOH-Rückstände und befolgen Sie nach der Elution den im Protokoll vorgesehenen 3-minütigen Heizschritt. |



hybcell-Identifizierung

| Problem | Mögliche Ursache | Maßnahmen |
|-------------------------------|---|---|
| Unspezifische hybcell Signale | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Unbearbeitete hybcells (die die Amplikons enthalten) werden zu lange nicht abgearbeitet (1-2 Tage) ▪ Überschreitung der maximalen Öffnungsdauer von geöffneten Puffern ▪ Gewaltames Einbringen der Pipettenspitze in die hybcell ▪ Flüssigkeiten sind leer oder das Liquid Handling des Geräts ist fehlerhaft ▪ Unzureichendes Waschverfahren ▪ Verwendung abgelaufener / verschmutzter hybcells | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Übertragen Sie die Amplikons nur dann in die hybcell, wenn sie sofort abgearbeitet werden können; wenn nicht, lagern Sie die Amplikons wie in der Anleitung beschrieben. ▪ Überprüfen Sie die Haltbarkeit der Puffer nach dem Öffnen der Flaschen ▪ Führen Sie die Pipettenspitze vorsichtig in die hybcell ein, ohne dabei ihre Öffnung zu verschließen. ▪ Überprüfen Sie die Füllstände aller Flüssigkeiten. Falls erforderlich, Flüssigkeiten nachfüllen. |
| Grid | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwendung eines "falschen" hybcell Produktes. ▪ Verwendung des "falschen" Protokolls. ▪ Verwendung abgelaufener/verschmutzter Produkte (z. B. aufgrund einer beschädigten Verpackung usw.) ▪ Software-Fehler ▪ Gerätefehler | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Prüfen Sie den hybcell-Typ und das verwendete Protokoll. ▪ Prüfen Sie das Verfallsdatum der Produkte. ▪ Prüfen Sie die Funktionsfähigkeit des hyborgs, indem Sie eine hybcell Control xC abarbeiten. ▪ Wiederholen Sie den Test. |
| Specificity Control | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Verwendung abgelaufener Produkte. ▪ Unzureichendes / kein PCR-Produkt in die hybcell pipettiert. ▪ Fehlerhafte PCR. ▪ Kein oder unzureichender PE-Buffer verwendet | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Prüfen Sie die Funktionsfähigkeit des hyborgs. ▪ Wiederholen Sie den Test. ▪ Prüfen Sie die Füllstände aller Flüssigkeiten. Falls erforderlich, Flüssigkeiten nachfüllen. |

Troubleshooting



Bei Problemen mit dem Produkt kontaktieren Sie bitte:



CubeDx GmbH
Westbahnstraße 55, 4300 St. Valentin, Austria
Contact information: www.cubedx.com

Zusätzliche Informationen über das Gerät sind in der Gebrauchsanweisung von hyborg Dx RED2 angegeben.

Schwerwiegende Vorkommnisse / Vigilanz

Stellen Sie sicher, dass schwerwiegende Vorkommnisse im Zusammenhang mit der Verwendung der Produkte unverzüglich Cube Dx oder den jeweiligen Vertriebspartnern und der zuständigen nationalen Behörde gemeldet werden. Bitte beachten Sie Ihre nationale Gesetzgebung zur Meldung schwerwiegender Vorkommnisse!

