

cobas[®] MTB-RIF/INH

Test kwasu nukleinowego do użytku z systemami cobas[®] 5800/6800/8800

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

cobas[®] MTB-RIF/INH

P/N: 09040617190

Do użytku z systemem cobas[®] 5800

cobas[®] MTB-RIF/INH Positive Control Kit

P/N: 09040625190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Do użytku z systemami cobas[®] 6800/8800

cobas[®] MTB-RIF/INH Positive Control Kit

P/N: 07833342190 lub
P/N: 09040625190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 lub
P/N: 09051953190

Spis treści

Przeznaczenie.....	4
Podsumowanie oraz opis testu.....	4
Odczynniki i materiały.....	8
Odczynniki i kontrole do testu cobas® MTB-RIF/INH.....	8
Odczynniki cobas® omni do przygotowywania próbek.....	10
Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników.....	11
Wymagania dotyczące użytkowania systemu cobas® 5800.....	11
Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800	12
Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800	13
Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800	13
Wymagane urządzenia i oprogramowanie	14
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	15
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	15
Użytkowanie odczynników	16
Dobra praktyka laboratoryjna	17
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	18
Próbka.....	18
Transport i przechowywanie próbek.....	18
Przechowywanie próbek inaktywowanych	18
Instrukcja obsługi	19
Uwagi dotyczące wykonania testu	19
Przetwarzanie próbek surowej płwociny.....	22
Przetwarzanie próbek w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo- pęcherzykowych (BAL)	22
Sonikacja próbek	23
Wykonanie testu cobas® MTB-RIF/INH w systemie cobas® 5800.....	25
Wykonanie testu cobas® MTB-RIF/INH w systemach cobas® 6800/8800.....	27
Wyniki	29
Kontrola jakości i ważność wyników w systemie cobas® 5800	29

Wyniki kontroli w systemie cobas ® 5800.....	29
Kontrola jakości i ważność wyników w systemach cobas ® 6800/8800.....	29
Interpretacja wyników.....	30
Interpretacja wyników w systemie cobas ® 5800.....	33
Interpretacja wyników w systemach cobas ® 6800/8800.....	34
Ograniczenia metody.....	35
Ocena wiarygodności.....	37
Najważniejsze parametry działania wykonywanego w systemach cobas ® 6800/8800.....	37
Inaktywacja próbek.....	37
Granica wykrywalności (LoD)	37
Heterooporność	38
Inkluzywność w odniesieniu do mutacji powiązanych z opornością	38
Swoistość w odniesieniu do kompleksu MTB typu dzikiego.....	39
Precyzja	40
Swoistość analityczna / reaktywność krzyżowa	41
Substancje wpływające na wynik testu.....	43
Błąd całego systemu.....	45
Skażenie krzyżowe	45
Ocena skuteczności przy użyciu próbek klinicznych.....	45
Równoważność/porównanie systemu	47
Dodatkowe informacje	48
Najważniejsze cechy oznaczenia	48
Oznaczenia	49
Pomoc techniczna	50
Wytwórca	50
Znaki towarowe i patenty.....	50
Prawo autorskie	50
Piśmiennictwo	51
Wersja dokumentu.....	52

Przeznaczenie

Test cobas® MTB-RIF/INH przeznaczony do stosowania z systemami cobas® 5800/6800/8800 to zautomatyzowany, jakościowy test diagnostyczny *in vitro*, wykorzystujący reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym do bezpośredniego wykrywania mutacji genu *rpoB* powiązanych z opornością na rifampicynę oraz mutacji genów *katG* i *inhA* powiązanych z opornością na izoniazyd u bakterii *Mycobacterium tuberculosis* w próbkach pobranych z układu oddechowego ludzi. Test ten jest przeznaczony do stosowania z próbkami surowej płwociny oraz przetrawionymi i odkażonymi (poddanymi działaniu N-acetylo-L-cysteiny/NaOH) próbkami osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), w przypadku których uzyskano w teście cobas® MTB wynik dodatni na obecność kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Test jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z testami do badań hodowli i ich lekowrażliwości oraz jako automatyczny test referencyjny stosowany razem z testem cobas® MTB jako pomoc w rozpoznaniu zakażenia gruźlicą wielolekooporną wywołaną przez prątki *M. tuberculosis* (ang. *Multidrug Resistant TB*, MDR-TB).

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe

Gruźlica jest zakażeniem bakteryjnym wywoływanym przez prątki należące do kompleksu MTBC. Stanowi poważny, globalny problem zdrowotny i należy do najczęstszych przyczyn zgonów z powodu chorób zakaźnych na świecie.¹ Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że około jedna czwarta światowej populacji jest zakażona prątkiem MTB przy szacowanej liczbie 10,6 milionów nowych przypadków gruźlicy oraz 1,3 miliona zgonów w 2022 r.¹ Według oszacowań 167 000 z 1,3 miliona wspomnianych zgonów dotyczyło osób zakażonych wirusem HIV (ang. *People Living With HIV*, PLHIV).¹

Kompleks *M. tuberculosis* stanowi grupę blisko spokrewnionych gatunków należących do rodzaju *Mycobacterium* wywołujących choroby u ludzi oraz zwierząt i obejmuje następujące gatunki: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (szczep Bacillus Calmette-Guérin), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. orygis*, prątek góralka skalnego oraz prątek stwierdzany u szympanów. Zakażenie jakimkolwiek z patogenów należących do kompleksu MTB może wywoływać gruźlicę, jednak najczęstszą przyczyną choroby jest *M. tuberculosis*. Prątki należące do kompleksu MTB najczęściej wywołują chorobę płuc. Może występować pozapłucna postać choroby, ale relatywnie częściej występuje ona u dzieci. *M. bovis* powoduje gruźlicę nawet u 2,8% pacjentów w różnych obszarach geograficznych.² Prątki inne niż *M. bovis* i *M. tuberculosis*, a należące do kompleksu MTB, rzadziej wywołują choroby u ludzi. Prątek *M. africanum* jest wiązany z występowaniem gruźlicy w krajach Afryki Zachodniej, *M. canetti* — na Półwyspie Somalijskim, natomiast *M. orygis* powoduje gruźlicę u ludzi i zwierząt w regionie od Afryki i Azji Południowej. Prątek *M. caprae* jest uważany za podgatunek *M. bovis*. Prątek *M. microti* wywołuje choroby głównie u gryzoni, *M. pinnipedii* jest związany z chorobą u fok, natomiast prątek *M. suricattae* wywołuje gruźlicę u surykattek w Republice Południowej Afryki. Prątek *M. mungi* zidentyfikowano jako przyczynę gruźlicy u mangust przegrywanych.³

Gruźlica jest chorobą przenoszoną w populacji ludzkiej drogą kropelkową. Większość osób zakażonych prątkiem *M. tuberculosis* nie wykazuje objawów chorobowych i po pierwotnym zakażeniu nie dochodzi u nich do rozwoju choroby. Jest to zjawisko znane jako utajone zakażenie prątkiem gruźlicy. Utajone zakażenia mogą utrzymywać się przez dekady i w większości przypadków nigdy nie prowadzą do rozwoju klinicznej postaci choroby. U niektórych osób dochodzi do pokonania mechanizmów obronnych, co powoduje przejście utajonego zakażenia prątkiem w aktywną gruźlicę. Dochodzi

do tego zwykle w ciągu pierwszych dwóch lat zakażenia lub po długim okresie utajenia. Ogólnie ryzyko przejścia zakażenia utajonego w aktywną gruźlicę wynosi 5–10% u pacjentów z zakażeniem utajonym. Niemniej ryzyko jest różne i zależy od wielu czynników, a także może ulec znacznemu zwiększeniu w wyniku immunosupresji np. w trakcie leczenia substancjami o takim działaniu⁴ (tj. inhibitorami TNF) oraz w przypadku zakażenia wirusem HIV.^{5,6} Osoby z postacią płucną aktywnej gruźlicy mogą wydalać kropelki oddechowe podczas kaszlu, mówienia oraz w trakcie procedur medycznych. Osoby z postacią płucną aktywnej choroby są uważane za wysoce zakaźne i wymagają przeprowadzenia koniecznej diagnostyki.

Diagnostyka w kierunku aktywnej gruźlicy jest prowadzona na podstawie wyników badań klinicznych/podejrzenia oraz na podstawie badań laboratoryjnych i radiologicznych. Pacjentów można poprosić o dostarczenie próbek z dróg oddechowych w celu wykonania rozmazów w kierunku bakterii kwasoopornych, hodowli prątków, a także w celu przeprowadzenia bezpośrednich testów amplifikacji kwasu nukleinowego. Niezbędne jest łączne prowadzenie hodowli prątków oraz badań kwasu nukleinowego w celu zmniejszenia ryzyka uzyskania wyników fałszywie ujemnych, a także w celu przeprowadzenia badań w kierunku lekowrażliwości prątków u pacjentów z wynikiem dodatnim.

Lekooporny szczep prątków gruźlicy jest zdefiniowany jako oporny na co najmniej jeden lek stosowany do leczenia gruźlicy. Gruźlica wielolekooporna (MDR-TB) jest zdefiniowana jako oporna na co najmniej izoniazyd i rifampicynę, czyli dwa najskuteczniejsze leki przeciwgruźlicze, a szczep prątków gruźlicy o rozszerzonej oporności na leki (ang. *Extensively Drug Resistant TB*, XDR-TB) wykazuje dodatkową oporność na rifampicynę i dowolny lek z grupy fluorochinolonów oraz na lek iniekcyjny drugiego rzutu (np. amikacynę) lub co najmniej jeden z leków: bedakilinę i linezolid.

Częstotliwość występowania gruźlicy wielolekoopornej różni się w zależności od regionu. Gruźlica wielolekooporna występuje częściej u ludzi uprzednio leczonych na gruźlicę. Leczenie gruźlicy wymaga długotrwałego podawania różnych leków i zwykle jest skuteczne. Niemniej w przypadku prątków MTB opornych na jeden lek lub więcej leków wyleczenie jest trudniejsze. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej i o rozszerzonej oporności na leki wymaga podawania wielu działających toksycznie leków przez dłuższy czas w porównaniu z leczeniem pacjentów z gruźlicą lekowrażliwą oraz wiąże się ono z mniejszym prawdopodobieństwem odniesienia sukcesu terapeutycznego.⁷

Gruźlicę można zdiagnozować na podstawie występujących objawów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych oraz radiologicznych, w tym rozmazów w kierunku kwasoopornych bakterii, hodowli prątków oraz testów amplifikacji kwasu nukleinowego. Badania, które określają poziom przeciwciał oraz odpowiedź na antygen, także mogą być przydatne (np. śródskórna próba tuberkulinowa, testy z pomiarem wydzielania interferonu gamma [INF γ] (IGRA)).⁸ Niemniej śródskórna próba tuberkulinowa oraz testy IGRA mogą dawać wyniki ujemne w przypadku aktywnej postaci choroby oraz nie nadają się do rozróżniania zakażenia utajonego od aktywnej choroby. Ostateczną diagnozę należy potwierdzić, uzyskując w hodowli wzrost drobnoustrojów lub wykrywając bezpośrednio w próbce klinicznej kwas nukleinowy prątków należących do kompleksu MTB. Badanie lekowrażliwości (ang. *Drug Susceptibility Testing*, DST) jest wymagane do potwierdzenia prawidłowości terapii empirycznej, ale jest czasochłonne, a wyniki można uzyskać dopiero po kilku tygodniach zależnie od zastosowanej metody. Opcjonalnie, aby szybciej uzyskać domniemaną diagnozę oporności na leki, można zastosować metody molekularne i określić lekooporność powiązaną z markerami genetycznymi bezpośrednio w materiale z próbek klinicznych lub izolatów uzyskanych z hodowli. Z uwagi na wysoką zakaźność prątków MTB oraz zjawisko narastającej lekooporności szybka i precyzyjna diagnoza jest istotnym elementem leczenia i kontroli MTB.⁸

Objaśnienie testu

Test **cobas**® MTB-RIF/INH do przeznaczony do stosowania z systemami **cobas**® 5800/6800/8800 to zautomatyzowany, jakościowy test PCR w czasie rzeczywistym, przewidziany jako automatyczny test referencyjny stosowany z testem **cobas**® MTB w celu wykrywania mutacji genu *rpoB* powiązanych z opornością na rifampicynę oraz mutacji genów *katG* i *inhA* powiązanych z opornością na izoniazyd u bakterii z kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*. Test ten jest przeznaczony do stosowania z próbkami surowej płwociny oraz przetrawionymi i odkażonymi (poddanymi działaniu N-acetylo-L-cysteiny/NaOH) próbkami osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), w przypadku których uzyskano w teście **cobas**® MTB wynik dodatni na obecność kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Wykrywanie DNA kompleksu MTB typu dzikiego spełnia funkcję kontroli wewnętrznej, monitorującej cały proces przygotowania próbki oraz amplifikacji PCR. Dodatkowo test wykorzystuje kontrolę o niskim mianie dodatnią i kontrolę ujemną.

Zasady procedury

Do testu **cobas**® MTB-RIF/INH wymagane jest przedanalizyczne upłynnienie próbki i inaktywacja prątków, po których następują sonikacja i całkowicie zautomatyzowane przygotowanie próbki (ekstrakcja i oczyszczanie kwasów nukleinowych) oraz amplifikacja i detekcja podczas reakcji PCR. Upłynnienie próbki i inaktywacja prątków zachodzą jednocześnie podczas inkubacji próbki z odczynnikiem **cobas**® Microbial Inactivation Solution (MIS). Sonikacja upłynnionej i inaktywowanej próbki jest przeprowadzana przed załadowaniem do systemów **cobas**® 5800/6800/8800. System **cobas**® 5800 zaprojektowano jako urządzenie zintegrowane. **cobas**® 6800/8800 składa się z modułu podawania próbek, modułu transferu, modułu przetwarzania oraz modułu analitycznego. Automatyczne przetwarzanie danych jest prowadzone przez oprogramowanie systemu **cobas**® 5800 lub **cobas**® 6800/8800, które przypisuje do wszystkich analiz wynik testu dodatni, ujemny lub nieważny. Wyniki można analizować bezpośrednio na ekranie systemu, można je eksportować lub wydrukować w postaci raportu.

Kwasy nukleinowe z próbek pacjentów i kontroli zewnętrznych są ekstrahowane jednocześnie. Podsumowując, kwas nukleinowy bakterii jest uwalniany na drodze chemicznego (MIS, **cobas**® **omni** Lysis Reagent), enzymatycznego (proteinaza) i fizycznego (sonikacja) działania niszczącego bakterie. Uwolniony kwas nukleinowy wiąże się z silikonową powierzchnią dodanych szklanych cząstek magnetycznych. Niezwiązane substancje i zanieczyszczenia, takie jak zdenaturowane białko, debris komórkowy i potencjalne inhibitory reakcji PCR usuwane są podczas kolejnych etapów płukania, a oczyszczony kwas nukleinowy jest następnie wymywany w podwyższonej temperaturze ze szklanych cząstek magnetycznych z użyciem buforu do elucji.

Wybiórcza amplifikacja i detekcja docelowego kwasu nukleinowego z próbki jest osiągana przez zastosowanie starterów przednich i wstecznych swoistych dla sekwencji genów docelowych. Osiemnaście mutacji (genu *rpoB*) powiązanych z opornością na rifampicynę jest wykrywanych przez jeden zestaw starterów i wiele sond swoistych dla mutacji. Siedem mutacji (genu *katG* i regionu promotorowego genu *inhA*) powiązanych z opornością na izoniazyd jest wykrywanych przez dwa zestawy starterów i wiele sond swoistych dla mutacji. Prątek MTB jest wykrywany przez jeden zestaw starterów i jedną sondę ukierunkowaną na wysoce konserwatywną, jednokopijną sekwencję genomową kompleksu MTB. Do amplifikacji metodą PCR wykorzystywana jest termostabilna polimeraza DNA. Sekwencje docelowa są amplifikowane jednocześnie przy użyciu uniwersalnego profilu amplifikacji PCR ze wstępnie zdefiniowanymi etapami temperatury i liczby cykli. Odczynnik Master Mix zamiast trifosforanu deoksytymidyny (dTTP) zawiera trifosforan deoksyurydyny (dUTP), który wbudowywany jest do nowo syntetyzowanego DNA (amplikonu). Jakikolwiek zanieczyszczające amplikony z poprzednich cykli pracy PCR są usuwane w pierwszym etapie cyklu termicznego dzięki aktywności enzymu

AmpErase, który znajduje się w mieszaninie Master Mix do reakcji PCR.⁹ Jednak nowo powstały amplikon nie jest eliminowany, gdyż enzym AmpErase w temperaturze przekraczającej 55°C ulega inaktywacji.

Mastermiks testu **cobas®** MTB-RIF/INH zawiera wiele sond swoistych dla mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę i mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd oraz jedną sondę swoistą dla kompleksu MTB. Sondy są znakowane za pomocą swoistych dla sekwencji docelowych fluorescencyjnych barwników reporterowych, pozwalających na równoczesne wykrywanie sekwencji docelowych mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę, mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd i kompleksu MTB w pięciu różnych kanałach docelowych (mutacje powiązane z opornością na rifampicynę są wykrywane w trzech z pięciu kanałów detekcyjnych).^{10, 11} W przypadku niezwiązania z sekwencją docelową sygnał fluorescencyjny nienaruszonych sond jest tłumiony przez barwnik wygaszenia. Podczas etapu amplifikacji PCR hybrydyzacja sond do swoistych sekwencji jednoniciowej matrycy DNA skutkuje cięciem nici przez polimerazę DNA w wyniku jej aktywności egzonukleazy w kierunku od końca 5' do 3', co powoduje rozdzielenie barwników markerowego i wygaszenia oraz wygenerowanie sygnału fluorescencyjnego. Z każdym cyklem PCR generowana jest zwiększająca się liczba rozszczepionych sond i jednocześnie wzrasta sumaryczny sygnał barwnika markerowego. Wykrycie w czasie rzeczywistym i rozróżnienie produktów reakcji PCR ma miejsce przez pomiar fluorescencji uwolnionych barwników reporterowych odpowiednio dla sekwencji docelowych mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę, mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd i kompleksu MTB.

Odczynniki i materiały

Odczynniki i kontrole do testu cobas® MTB-RIF/INH

Materiały dostarczone dla testu cobas® MTB-RIF/INH zawiera Tabela 1. Wszystkie nieotwarte odczynniki i kontrole należy przechowywać zgodnie z zaleceniami, które zawierają tabele od Tabela 1 do Tabela 4. Materiały wymagane, ale niedostarczone: patrz tabele od Tabela 2 do Tabela 4 oraz Tabela 8 i Tabela 9.

Tabela 1 cobas® MTB-RIF/INH

cobas® MTB-RIF/INH

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

Kaseta na 192 testów (P/N 09040617190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw
Roztwór proteiny (PASE)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% proteiny, glicerol EUH210: Karta charakterystyki dostępna na żądanie. EUH208: Zawiera subtylizynę z <i>Bacillus subtilis</i> . Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.	22,3 ml
Generyczny rozcieńczalnik próbek (GSD)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstruktu opłaszczanego RNA innego niż MTB, 0,002% poly(rA) RNA (syntetycznego), < 0,1% azydku sodu	21,2 ml
Bufor do elucji (EB)	Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoetan	21,2 ml
Odczynnik Master Mix 1 (MMX-R1)	Octan magnezu, wodorotlenek potasu, < 0,1% azydku sodu	7,5 ml
Odczynnik MTB-RIF/INH Master Mix 2 (MTB-RIF/INH MMX-R2)	Bufor trycynowy, octan potasu, EDTA, glicerol, 18% dimetylosulfotlenku, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,1% Tween 20, < 0,1% azydku sodu, < 0,1% polimerazy DNA Z05, < 0,1% enzymu AmpErase (uracylo-N glikozylazy) (bakteryjnego), < 0,01% starterów wodzących i odwrotnych, < 0,01% znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych swoistych dla mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę, mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd oraz kompleksu MTB, < 0,01% aptameru oligonukleotydowego	9,7 ml

Tabela 2 cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit

cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit

Przechowywać w 2–8°C

Do użytku z systemem cobas® 5800 (P/N 09040625190)

Do użytku z systemami cobas® 6800/8800 (P/N 07833342190 lub P/N 09040625190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw
Kontrola dodatnia MTB-RIF/INH (MTB-RIF/INH (+) C)	Bufor Tris, < 0,05% azydku sodu, < 0,05% EDTA, 0,002% poly(rA), < 0,01% niezakaźnego DNA plazmidowego (bakteryjnego) zawierającego sekwencje genomowe prątków <i>M. tuberculosis</i> (16S, zmutowany gen <i>rpoB</i> i zmutowany region promotorowy genu <i>inhA</i>)	16 ml (16 × 1 ml)

Tabela 3 cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

Do użytku z systemem cobas® 5800 (P/N 09051953190)

Do użytku z systemami cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 lub P/N 09051953190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Bufor Tris, < 0,1% azydku sodu, EDTA, 0,002% poly(rA) RNA (syntetycznego)	16 ml (16 × 1 ml)

Odczynniki cobas® omni do przygotowywania próbek

Tabela 4 Odczynniki **cobas® omni** do przygotowywania próbek*

Odczynniki	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie**
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997546190)	Szklane cząstki magnetyczne, bufor Tris, 0,1% metylo-4- hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	480 testów	Nie dotyczy
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997511190)	Bufor Tris, 0,1% metylo-4- hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	4 × 875 ml	Nie dotyczy
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997538190)	43% (udział wagowy) tiocyjanian guanidyny***, 5% (udział wagowo-obj.) polidokanol***, 2% (udział wagowo-obj.) ditiotreititol***, dwuwodny cytrynian sodu	4 × 875 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy/ochronę słuchu. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Przechowywać w 15–30°C (P/N 06997503190)	Dwuwodny cytrynian sodu, 0,1% metylo-4- hydroksybenzoesan	4,2 l	Nie dotyczy

* Te odczynniki nie są dołączone do zestawu testu **cobas® MTB-RIF/INH**. Należy zapoznać się z listą wymaganych materiałów dodatkowych (Tabela 8 do Tabela 10).

** Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

*** Substancja niebezpieczna.

Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników

Odczynniki należy przechowywać i użytkować zgodnie z informacjami, które zawiera Tabela 5, Tabela 6 i Tabela 7.

Jeśli odczynniki nie zostały umieszczone w systemie **cobas**® 5800 ani w systemach **cobas**® 6800/8800, należy przechowywać je w odpowiedniej temperaturze, zgodnie z informacjami, które zawiera Tabela 5.

Tabela 5 Przechowywanie odczynników (umieszczonych poza systemem)

Odczynnik	Temperatura przechowywania
cobas ® MTB-RIF/INH	2–8°C
cobas ® MTB-RIF/INH Positive Control Kit	2–8°C
cobas ® Buffer Negative Control Kit	2–8°C
cobas ® omni Lysis Reagent	2–8°C
cobas ® omni MGP Reagent	2–8°C
cobas ® omni Specimen Diluent	2–8°C
cobas ® omni Wash Reagent	15–30°C

Wymagania dotyczące użytkowania systemu **cobas**® 5800

Odczynniki umieszczone w systemie **cobas**® 5800 przechowywane są w odpowiedniej temperaturze, a ich data przydatności do użycia monitorowana jest przez system. System umożliwia wykorzystanie odczynników tylko w przypadku spełnienia wszystkich warunków, które zawiera Tabela 6. System automatycznie uniemożliwia wykorzystanie przeterminowanych odczynników. Tabela 6 pozwala na zrozumienie warunków użytkowania odczynników wymuszanych przez system **cobas**® 5800.

Tabela 6 Warunki dotyczące daty ważności odczynników wymuszane przez system **cobas**® 5800

Odczynnik	Data ważności zestawu	Stabilność otwartego zestawu	Liczba cykli pracy, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie aparatu
cobas ® MTB-RIF/INH	Nieprzekroczona	90 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 40 cykli pracy	Maks. 36 dni ^b
cobas ® MTB-RIF/INH Positive Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maks. 36 dni ^b
cobas ® Buffer Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maks. 36 dni ^b
cobas ® omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas ® omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas ® omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas ® omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy

^a Odczynniki do jednorazowego użycia.

^b Czas jest mierzony od umieszczenia po raz pierwszy odczynnika w systemie **cobas**® 5800.

Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800

Odczynniki umieszczone w systemach cobas® 6800/8800 przechowywane są w odpowiedniej temperaturze, a ich data przydatności do użycia monitorowana jest przez system. Systemy cobas® 6800/8800 umożliwiają wykorzystanie odczynników tylko w przypadku spełnienia wszystkich warunków, które zawiera Tabela 7. System automatycznie uniemożliwia wykorzystanie przeterminowanych odczynników. Tabela 7 pozwala na zrozumienie wymuszonych przez systemy cobas® 6800/8800 warunków użytkowania odczynników.

Tabela 7 Warunki dotyczące daty ważności odczynników wymuszane przez systemy cobas® 6800/8800

Odczynnik	Data ważności zestawu	Stabilność otwartego zestawu	Liczba cykli pracy, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie aparatu (łącznie czas w aparacie poza chłodziarką)
cobas® MTB-RIF/INH	Nieprzekroczona	90 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 40 cykli pracy	Maksymalnie 40 godzin
cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maksymalnie 10 godzin
cobas® Buffer Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maksymalnie 10 godzin
cobas® omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie ^b	Nie dotyczy	Nie dotyczy

^a Odczynniki do jednorazowego użycia.

^b Czas jest mierzony od umieszczenia po raz pierwszy odczynnika w systemach cobas® 6800/8800.

Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800

Tabela 8 Materiały i materiały zużywalne do użytku z systemem **cobas® 5800**

Materiał	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 1 ml	04639642001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 300 µl	07345607001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Torba na odpady stałe	07435967001
lub	lub
Torba na odpady stałe z wkładką	08030073001

Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800

Tabela 9 Materiały i materiały zużywalne do użytku z systemami **cobas® 6800/8800**

Materiał	P/N
cobas® omni Processing Plate	05534917001
cobas® omni Amplification Plate	05534941001
cobas® omni Pipette Tips	05534925001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Torba na odpady stałe i pojemnik na odpady stałe	07435967001 i 07094361001
lub	lub
Torba na odpady stałe z wkładką i pojemnik na odpady stałe do szuflady zestawu	08030073001 i 08387281001

Tabela 10 Inne materiały i materiały eksploatacyjne wymagane do przedanalizycznego przebiegu pracy

Materiały
cobas® Microbial Inactivation Solution (P/N 08185476001)
Sonikator do probówek TS 5 (Rinco Ultrasonics AG — P/N 46690)
Polipropylenowe, zakręcane probówki 5 ml, 75 × 13 mm, z okrągłym dnem (Sarstedt — probówka P/N 60.504.010, nakrętka P/N 65.163)*
Jasnozielony statyw MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (Roche — P/N 03118878001 lub odpowiednik)**
Wirówka (z opcją ograniczenia względnej siły odśrodkowej, RCF, do maks. 3000 × g, zgodna z zakręcanymi probówkami 75 × 13 mm)
Mieszadło wibracyjne (vortex)
Odporne na działanie temperatury etykiety z kodem kreskowym (OPAL Associates AG, P/N 20300824 TTR PE-Folie Pharma lub odpowiednik)***

- * Użycie probówek innych od zalecanych powyżej musi zostać zweryfikowane przez użytkownika przed wprowadzeniem do procedury testu **cobas®** MTB-RIF/INH w laboratorium.
- ** Do użycia sonikatora do probówek TS 5 wymagane są statywy MPA 13 mm. Aby uzyskać szczegółową listę do zamawiania odpowiedników ramek na próbki w innych kolorach lub o innych zakresach numerów, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem Roche. Należy zauważyć, że statywy RD5 nie są zgodne z sonikatorem do probówek TS 5.
- *** W celu uzyskania dalszych informacji na temat specyfikacji kodu kreskowego należy zapoznać się z Asystentem użytkownika i/lub Przewodnikami użytkownika systemów **cobas®** 5800/6800/8800. Użycie etykiet z kodem kreskowym innych od zalecanych powyżej musi zostać zweryfikowane przez użytkownika przed wprowadzeniem do procedury testu **cobas®** MTB-RIF/INH w laboratorium. W celu uzyskania dalszych informacji na temat zgodnych etykiet z kodem kreskowym i sugestii dotyczących weryfikacji zgodności należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem Roche. Stosowanie niezgodnych etykiet z kodem kreskowym może prowadzić do uszkodzenia probówki podczas sonikacji i wynikającego z niego skażenia urządzenia.

Wymagane urządzenia i oprogramowanie

W urządzeniu **cobas®** 5800 musi być zainstalowane oprogramowanie systemu **cobas®** 5800 oraz pakiet oprogramowania do analizy **cobas®** MTB-RIF/INH dla urządzenia **cobas®** 5800. Z systemem zostanie dostarczone oprogramowanie Data Manager oraz komputer PC dla systemu **cobas®** 5800.

Na aparatach **cobas®** 6800/8800 musi być zainstalowane oprogramowanie systemów **cobas®** 6800/8800 oraz pakiet oprogramowania do analizy **cobas®** MTB-RIF/INH do stosowania w urządzeniach **cobas®** 6800/8800. Z systemem dostarczany jest serwer Instrument Gateway (IG).

Tabela 11 Urządzenia

Wyposażenie	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System (opcja, na ruchomej platformie)	06379672001
cobas® 6800 System (nieruchomy)	05524245001
cobas® 8800 System	05412722001
Moduł dostarczania próbek	06301037001

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z Asystentem użytkownika i/lub Przewodnikami użytkownika systemu **cobas®** 5800 lub systemów **cobas®** 6800/8800.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość niniejszego testu podczas użytkowania odczynników oraz mieszanin do amplifikacji należy zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec skażeniu.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Wszystkie próbki pacjentów należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny. Dlatego ze wszystkimi próbkami biologicznymi należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując procedury dobrej praktyki laboratoryjnej i odpowiednią ocenę ryzyka, takie jak określono w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CLSI Document M29-A4 oraz Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual wydanym przez WHO.¹²⁻¹⁴ Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel przeszkolony w pracy z materiałami zakaźnymi oraz w stosowaniu testu cobas® MTB-RIF/INH i systemów cobas® 5800/6800/8800.
- Cały personel winien nosić osobisty sprzęt ochronny, w tym fartuchy laboratoryjne, rękawice jednorazowe oraz ochronę oczu i dróg oddechowych zgodnie z praktykami i procedurami bezpieczeństwa obowiązującymi w danej instytucji, a ponadto przestrzegać procedur bezpieczeństwa obowiązujących w tej instytucji podczas pracy z chemikaliami i próbkami biologicznymi.
- Każde laboratorium musi, na podstawie stosownej oceny ryzyka, określić niezbędne etapy postępowania z próbkami przed inaktywacją za pomocą odczynnika MIS i po niej, jak również przestrzegać, na podstawie stosownej oceny ryzyka, zalecanych przepisów dotyczących bezpieczeństwa biologicznego oraz wytycznych lub przepisów miejscowych i obowiązujących w danej placówce.¹⁴
- Skuteczna inaktywacja prątków gruźlicy zależy od przestrzegania procedur opisanych w niniejszym dokumencie oraz od całkowitego wymieszania próbki z odczynnikiem MIS. Upłynnianie próbek oraz inaktywację prątków przez MIS należy przeprowadzać zgodnie z wytycznymi lub przepisami miejscowymi i obowiązującymi w danej instytucji oraz w oparciu o stosowną ocenę ryzyka.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. Jeżeli nastąpi rozlanie, należy natychmiast przeprowadzić dezynfekcję zgodnie z odpowiednimi procedurami ośrodka.
- W przypadku rozlania próbek w odczynniku MIS (który zawiera tiocyjanian guanidyny) nie wolno dopuścić, aby zetknął się ze środkami dezynfekującymi zawierającymi podchloryn sodu, takimi jak wybielacz. Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.
- Jeśli dojdzie do rozlania próbek w odczynniku MIS, NAJPIERW należy wyczyścić powierzchnię odpowiednim detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie przetrzeć ją 70% etanolem.
- Odczynnik MIS jest wrażliwy na światło i wysyłany w butelkach chroniących przed światłem. MIS przechowywać w pozycji pionowej.
- W celu zagwarantowania określonego działania testu należy stosować wyłącznie dostarczone lub wymienione potrzebne materiały eksploatacyjne.

- Ściśle przestrzegać podanych procedur i wytycznych w celu zapewnienia prawidłowego wykonania testu. Wszelkie odchylenia od procedur i wytycznych mogą mieć wpływ na ustaloną skuteczność testu.
- Jeżeli w trakcie pracy z próbkami i na etapie ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli kontaminacji pomiędzy próbkami, może dojść do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.
- Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w lokalnym przedstawicielstwie Roche.
- Należy poinformować lokalny właściwy organ oraz producenta o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Użytkowanie odczynników

- Aby uniknąć przeniesienia pomiędzy próbkami, odczynnikami lub kontrolami, z wszystkimi odczynnikami, kontrolami i próbkami należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą kasetę odczynnikową, rozcieńczalnik, odczynnik lizujący i odczynnik do mycia, aby upewnić się, że nie ma jakiegokolwiek wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.
- Odczynniki **cobas® omni** Lysis Reagent i MIS zawierają tiocyjanian guanidyny, który jest potencjalnie niebezpieczną substancją chemiczną. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia.
- Nie wolno dopuszczać do kontaktu odczynnika **cobas® omni** Lysis Reagent lub MIS, zawierającego tiocyjanian guanidyny, z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.
- Zużyte zestawy kontroli zawierają przekłute fiolki z pozostałościami odczynnika, należy zachować szczególną ostrożność podczas utylizacji, aby uniknąć rozlania i kontaktu.
- Zestawy testu **cobas®** MTB-RIF/INH, kontroli dodatniej **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, kontroli ujemnej **cobas®** Buffer Negative Control Kit, odczynnik **cobas® omni** MGP Reagent oraz rozcieńczalnika **cobas® omni** Specimen Diluent zawierają azydek sodu jako substancję konserwującą. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia. Jeżeli dojdzie do rozlania wymienionych odczynników, przed wytarciem należy rozcieńczyć je wodą.
- Wszystkie materiały, które przypadkowo weszły w kontakt z próbkami i odczynnikami, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić tytoniu w obszarach roboczych.
- Wszystkie próbki biologiczne, w tym próbki poddane działaniu odczynnika MIS, należy traktować jako mogące przenosić czynniki zakaźne zgodnie z wytycznymi lub przepisami lokalnymi lub obowiązującymi w danej placówce i/lub w oparciu o stosowną ocenę ryzyka.¹⁴
- Podczas pracy z próbkami i odczynnikami należy nosić rękawiczki laboratoryjne, fartuch laboratoryjny oraz indywidualne środki ochrony oczu i dróg oddechowych zgodnie z procedurami bezpieczeństwa obowiązującymi w danej placówce. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawiczek. W celu uniknięcia zanieczyszczenia należy zmieniać rękawiczki pomiędzy pracą z próbkami i zestawami **cobas®** MTB-RIF/INH, **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit oraz odczynnikami **cobas® omni** i materiałami eksploatacyjnymi.
- Po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami, a także po zdjęciu rękawic, należy dokładnie zdezynfekować i umyć ręce.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,6% podchlorynu sodu lub potasu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej. Następnie przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.
- Jeśli na powierzchni urządzenia **cobas®** 5800/6800/8800 dojdzie do rozlania płynu, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w Asystencie użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemów **cobas®** w celu prawidłowego wyczyszczenia i odkażenia powierzchni aparatu.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Próbka

Z testem cobas® MTB-RIF/INH można używać próbek surowej płwociny oraz poddanych działaniu NALC-NaOH próbek w postaci osadu z płwociny oraz osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL).

Transport i przechowywanie próbek

Próbki surowej płwociny można przechowywać i/lub transportować przez maks. 3 dni w temperaturze od 2°C do 35°C, a następnie przez maks. 7 dni w temperaturze od 2°C do 8°C przed upłynięciem i inaktywacją próbki w MIS. W celu długoterminowego przechowywania próbek surowej płwociny niepoddanej działaniu MIS zaleca się stosować temperatury $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

Próbki w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) poddane działaniu NALC-NaOH można przechowywać przez maks. 7 dni w temperaturze od 2°C do 8°C przed inaktywacją próbki w odczynniku MIS. Niepoddane działaniu odczynnika MIS próbki w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) można przechowywać długoterminowo w stanie zamrożonym w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$ przez maks. 9 miesięcy, wliczając dwa cykle zamrażania/rozmarzania.

Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i/lub międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników zakaźnych.

Przechowywanie próbek inaktywowanych

Próbki surowej płwociny oraz osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) poddanych działaniu NALC-NaOH poddane działaniu odczynnika MIS (inaktywowane) można przechowywać przez maks. 12 godzin w temperaturze od 15°C do 35°C, przez maks. 7 dni w temperaturze od 2°C do 8°C i przez 30 dni w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$, wliczając dwa cykle zamrażania/rozmarzania przed przetwarzaniem w systemach cobas® 5800/6800/8800.

Uwaga: próbki poddane działaniu MIS mogą się nie zamrażać ze względu na wysoką zawartość izopropanolu.

Uwaga: sonikację próbek można przeprowadzić w dowolnym czasie po początkowej inkubacji z odczynnikiem MIS przez co najmniej 60 minut. Więcej informacji na ten temat zawiera część „Sonikacja próbek”.

Instrukcja obsługi

Uwagi dotyczące wykonania testu

- Nie należy używać odczynników testu **cobas®** MTB-RIF/INH, **cobas®** MTB-RIF/INH Positive Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, MIS i odczynników **cobas® omni** po upływie ich daty ważności.
- Nie wykorzystywać ponownie materiałów zużywalnych. Są one przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Upewnić się, że odporne na działanie temperatury etykiety z kodem kreskowym na próbkach na próbki są skierowane do otwartych od góry szczelin z boku ramek na próbki MPA i widoczne przez te szczeliny. Patrz Rys. 1 oraz Asystent użytkownika i/lub Przewodniki użytkownika systemów **cobas®** 5800/6800/8800, aby zapoznać się z odpowiednimi specyfikacjami kodów kreskowych oraz dodatkowymi informacjami dotyczącymi ładowania próbek na próbki.
- Po sonikacji, a przed załadowaniem do systemu **cobas®** 5800/6800/8800, należy się upewnić, że próbki na próbki są otwarte.
- Instrukcje dotyczące prawidłowej konserwacji urządzeń zawiera Asystent użytkownika i/lub Przewodniki użytkownika systemów **cobas®** 5800/6800/8800.

Przed przebiegiem testu **cobas®** MTB-RIF/INH w systemach **cobas®** 5800/6800/8800 próbki należy przetworzyć zgodnie z informacjami podanymi w częściach: „Przetwarzanie próbek surowej płwociny”, „Przetwarzanie próbek w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)” oraz „Sonikacja próbek”. Podsumowanie skróconych, reprezentatywnych przebiegów pracy zawierają Tabela 12 w przypadku próbek surowej płwociny oraz Tabela 13 w przypadku próbek w postaci osadu. Dalsze informacje podano w kolejnych częściach.

Uwaga: postępowanie z próbkami przed inaktywacją za pomocą odczynnika **cobas®** MIS i po niej powinno być zgodne z wytycznymi lub przepisami miejscowymi i obowiązującymi w danej placówce i/lub oparte na stosownej ocenie ryzyka.¹⁴

Uwaga: sonikację próbek poddanych działaniu odczynnika MIS należy przeprowadzać zgodnie z wytycznymi lub przepisami miejscowymi i obowiązującymi w danej placówce oraz w oparciu o stosowną ocenę ryzyka.¹⁴

Tabela 12 Przegląd procedury — próbka surowej płwociny

1				Dodać 2 części odczynnika MIS na 1 część surowej płwociny
2		30–60 sekund		Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund
3		≥ 60 minut		Inkubować próbkę przez co najmniej 60 minut w temperaturze 15–30°C (temperaturze pokojowej)
4		30–60 sekund		Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund
5		1,2 ml na 1 test 2,4 ml na 2 testy 3,6 ml na 3 testy		Przenieść od 1,2 do 3,6 ml próbki poddanej działaniu MIS do zakręcanej probówki wtórnej
6		5 minut		Przeprowadzić sonikację próbki poddanej działaniu odczynnika MIS
7		Maks. 1 minuta		Wirować próbkę nie dłużej niż przez 1 minutę z maksymalną siłą odśrodkową (RCF) 3000 × g
8				Załadować otwartą probówkę z próbką do systemu cobas® 5800 lub cobas® 6800/8800 i uruchomić cykl pracy z użyciem próbki surowej płwociny

Tabela 13 Przegląd procedury — próbka w postaci osadu

1		0,2 ml na 1 test 0,4 ml na 2 testy 0,6 ml na 3 testy	Wymieszać mieszadłem wibracyjnym i przenieść od 0,2 do 0,6 ml próbki w postaci osadu do zakręcannej probówki wtórnej
2	  		Dodać 5 części odczynnika MIS na 1 część próbki w postaci osadu • 1 ml odczynnika MIS na 1 test (0,2 ml próbki w postaci osadu) • 2 ml odczynnika MIS na 2 testy (0,4 ml próbki w postaci osadu) • 3 ml odczynnika MIS na 3 testy (0,6 ml próbki w postaci osadu)
3		30–60 sekund	Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund
4		≥ 60 minut	Inkubować próbkę przez co najmniej 60 minut w temperaturze 15–30°C (temperaturze pokojowej)
5		30–60 sekund	Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund
6		5 minut	Przeprowadzić sonikację próbki poddanej działaniu odczynnika MIS
7		Maks. 1 minuta	Wirować próbkę nie dłużej niż przez 1 minutę z maksymalną siłą odśrodkową (RCF) 3000 × g
8			Załadować otwartą probówkę z próbką do systemu cobas ® 5800 lub cobas ® 6800/8800 i uruchomić cykl pracy z użyciem próbki w postaci osadu

Przetwarzanie próbek surowej płwociny

- Upewnić się, że pojemnik z surową płwociną jest prawidłowo oznakowany i zawiera co najmniej 0,4 ml płwociny. Jeśli próbka była przechowywana w stanie zamrożonym, rozmrozić ją i odczekać, aż osiągnie temperaturę otoczenia.
- Przed użyciem odwrócić butelki z MIS od dwóch do czterech razy.
- Otworzyć pojemnik z płwociną i dodać około dwie części odczynnika MIS do jednej części próbki płwociny (np. 2 ml odczynnika MIS do 1 ml próbki płwociny), szacując wzrokowo objętość i używając jednorazowej pipety. Zamknąć szczelnie pojemnik z płwociną.
- Zamykać butelki z MIS natychmiast po użyciu.
- Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund.

Uwaga: należy się upewnić, że cała próbka płwociny została wymieszana z odczynnikiem MIS.

- Inkubować próbkę przez co najmniej 60 minut w temperaturze 15–30°C (temperaturze pokojowej).

Uwaga: dopuszczalne warunki przechowywania opisano w części „Przechowywanie inaktywowanej próbki”.

- Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund lub do czasu, gdy próbka będzie całkowicie jednorodna.
- Przenieść co najmniej 1,2 ml, ale nie więcej niż 3,6 ml próbki płwociny poddanej działaniu odczynnika MIS do oznakowanej odporną na działanie temperatury etykiety z kodem kreskowym polipropylenowej, zakręcanej próbówki 5 ml, 75 × 13 mm, z okrągłym dnem (Sarstedt — próbówka P/N 60.504.010, nakrętka P/N 65.163). Dokładnie zamknąć próbówkę.

Uwaga: przed przeniesieniem próbki należy się upewnić, że informacje na etykiecie z kodem kreskowym na pojemniku z płwociną i na próbówce wtórnej 5 ml są zgodne.

Uwaga: patrz Tabela 14.

- Przeprowadzić sonikację inaktywowanej próbki zgodnie z informacjami w części „Sonikacja próbki” przed przebiegiem testu cobas® MTB-RIF/INH.

Przetwarzanie próbek w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)

- Upewnić się, że pojemnik z poddaną działaniu NALC-NaOH próbką w postaci osadu z płwociny lub osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) jest prawidłowo oznakowany i zawiera co najmniej 0,2 ml próbki. Jeśli próbka była przechowywana w stanie zamrożonym, rozmrozić ją i odczekać, aż osiągnie temperaturę otoczenia.
- Mieszać próbkę w postaci osadu na mieszadle wibracyjnym przez co najmniej 10 sekund.

- Przenieść co najmniej 0,2 ml, ale nie więcej niż 0,6 ml próbki w postaci osadu do oznakowanej etykietą z kodem kreskowym polipropylenowej, zakręcanej probówki 5 ml, 75 × 13 mm, z okrągłym dnem (Sarstedt — probówka P/N 60.504.010, nakrętka P/N 65.163).

Uwaga: przed przeniesieniem próbki należy się upewnić, że informacje na etykiecie z kodem kreskowym na pojemniku z próbką i na probówce wtórnej 5 ml są zgodne.

- Przed użyciem odwrócić butelki z MIS od dwóch do czterech razy.
- Dodać pięć części odczynnika MIS do jednej części próbki (np. 1 ml odczynnika MIS do 0,2 ml próbki). Zamknij szczelnie probówkę.

Uwaga: patrz Tabela 14.

- Zamykać butelki z MIS natychmiast po użyciu.
- Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund.

Uwaga: należy się upewnić, że cała próbka została wymieszana z odczynnikiem MIS.

- Inkubować próbkę przez co najmniej 60 minut w temperaturze 15–30°C (temperaturze pokojowej).

Uwaga: dopuszczalne warunki przechowywania opisano w części „Przechowywanie inaktywowanej próbki”.

- Energicznie wytrząsać lub mieszać na mieszadle wibracyjnym przez 30–60 sekund.
- Przeprowadzić sonikację inaktywowanej próbki zgodnie z informacjami w części „Sonikacja próbki” przed przebiegiem testu cobas® MTB-RIF/INH.

Tabela 14 Wymagania dotyczące objętości próbki poddanej działaniu odczynnika cobas® Microbial Inactivation Solution na potrzeby przebiegu testu cobas® MTB-RIF/INH

Liczba testów do wykonania z probówki wtórnej	Minimalna wymagana objętość próbki poddanej działaniu odczynnika MIS	Maksymalna wymagana objętość próbki poddanej działaniu odczynnika MIS
Zlecenie 1 testu	1,2 ml	3,6 ml
Zlecenie 2 testów*	2,4 ml	3,6 ml
Zlecenie 3 testów*	3,6 ml	3,6 ml

* Można używać do przetwarzania w partii mieszanej z innymi testami cobas® 5800/6800/8800 z zastosowaniem tego samego typu próbki lub do powtórzeń testów.

Sonikacja próbek

- Sonikację próbek na potrzeby przebiegu testu cobas® MTB-RIF/INH należy przeprowadzać przy użyciu sonikatora TS 5 firmy Rinco Ultrasonics AG (P/N 46690). Stosowanie innych urządzeń do sonikacji może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub nieważnych. Obsługę sonikatora opisano szczegółowo w Przewodniku użytkownika wydanym przez producenta urządzenia.

- Umieścić w statywie MPA pięć oznakowanych etykietami z kodem kreskowym, zamkniętych nakrętką probówek zawierających od 1,2 ml do 3,6 ml próbki poddanej działaniu odczynnika MIS.

Uwaga: upewnić się, że odporne na działanie temperatury etykiety z kodem kreskowym na probówkach na próbki są skierowane do otwartych od góry szczelin z boku ramek na próbki MPA i widoczne przez te szczeliny (patrz Rys. 1).

Uwaga: upewnić się, że na każdej próbówce znajduje się jedna odporna na działanie temperatury etykieta z kodem kreskowym.

Uwaga: upewnić się, że zajętych jest wszystkich pięć miejsc na próbki w statywie MPA. Jeśli dostępnych jest mniej niż pięć probówek zawierających próbkę poddaną działaniu odczynnika MIS, w pozostałych pozycjach należy umieścić zastępcze, wypełnione wodą lub odczynnikiem MIS probówki tego samego typu z odporną na działanie temperatury etykietą z kodem kreskowym.

Rys. 1 Prawidłowe umieszczenie probówek na próbki w statywie MPA przed sonikacją



- Uruchomić sonikator do probówek.
- Wybrać zdefiniowany wstępnie profil sonikacji Respiratory Samples (Próbki z dróg oddechowych).
- Otworzyć sonikator do probówek i włożyć statyw MPA zgodnie z instrukcjami producenta.
- Zamknąć sonikator do probówek.
- Uruchomić cykl pracy sonikacji.
- Upewnić się, że cykl pracy sonikacji zakończył się powodzeniem, a następnie wyjąć statyw MPA.

Uwaga: przewiduje się, że w trakcie cyklu pracy sonikacji probówki na próbki się nagrzeją. Wyjmując statyw MPA z probówkami na próbki, należy zachować ostrożność.

Uwaga: w razie niepowodzenia sonikacji należy zapoznać się z instrukcjami producenta, skorygować przyczynę i powtórzyć cykl pracy sonikacji, odczekawszy uprzednio co najmniej 15 minut, aż próbki ostygną.

- Próbki poddane działaniu odczynnika MIS i sonikacji można następnie przeanalizować w teście cobas® MTB-RIF/INH lub przechowywać zgodnie z informacjami w części „Przechowywanie inaktywowanych próbek”.

Wykonanie testu cobas® MTB-RIF/INH w systemie cobas® 5800

Test cobas® MTB-RIF/INH można przeprowadzić przy użyciu minimalnej objętości próbki 1,2 ml, z której 850 µl jest przetwarzanych. Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Asystencie użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemu cobas® 5800. Rys. 2 podsumowuje tę procedurę.

- Przed otwarciem probówek i załadowaniem próbek do systemu cobas® 5800 zaleca się oddzielić pozostałości komórek i macierzy, odwirowując próbkę przez maksymalnie 1 minutę z maksymalną siłą odśrodkową (RCF) $3000 \times g$.
- Jeden cykl pracy może obejmować różne materiały próbki (surowa płwocina, próbki w postaci osadu).

Uwaga: jeśli próbki były przechowywane przez ponad 1 godzinę po sonikacji a przed wirowaniem, należy je mieszać na mieszadle wirowym przez co najmniej 10 sekund.

Uwaga: pominięcie etapu wirowania może spowodować zwiększenie występowania skrzepów próbki w systemie cobas® 5800.

Rys. 2 Procedura testu cobas® MTB-RIF/INH w systemie cobas® 5800

1	Zaloguj się do systemu
2	Załaduj próbki do systemu - Otwórz probówki - Przenieś probówkę bezpośrednio na statyw - Załaduj ramki na próbki do systemu - System przeprowadzi automatyczne przygotowanie - Zleć testy - Wybierz opcję „Raw sputum” (Surowa płwocina), aby zlecić test próbek surowej płwociny poddanych działaniu odczynnika MIS - Wybierz opcję „Sediment” (Próbka w postaci osadu), aby zlecić test próbek w postaci osadu z płwociny / osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) poddanych działaniu odczynnika MIS
3	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: - Załaduj swoistą dla testu kasetę (kasety) odczynnikową (odczynnikiowe) - Załaduj mini statywy z kontrolami - Załaduj końcówki do przetwarzania - Załaduj końcówki do elucji - Załaduj płytki do przetwarzania - Załaduj płytki na odpady płynne - Załaduj płytki amplifikacyjne - Załaduj kasetę MGP - Uzupełnij rozcieńczalnik próbki - Uzupełnij odczynnik lizujący - Uzupełnij odczynnik do mycia
4	Rozpocznij cykl pracy przez wybranie przycisku „Start processing” (Start przetwarzania) w interfejsie użytkownika; wszystkie kolejne cykle pracy rozpoczną się automatycznie, o ile nie zostaną ręcznie odłożone
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówki z próbkami spełniające wymagania dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść urządzenie - Wyjmij puste mini statywy z kontrolami - Wyładuj pustą swoistą dla testu kasetę (kasety) odczynnikową (odczynnikiowe) - Opróżnij szufladę na płytki do amplifikacji - Usuń odpady płynne - Usuń odpady stałe

Wykonanie testu cobas® MTB-RIF/INH w systemach cobas® 6800/8800

Test cobas® MTB-RIF/INH można przeprowadzić przy użyciu minimalnej wymaganej objętości próbki 1,2 ml, z której 850 µl jest przetwarzanych. Obsługę aparatu opisano szczegółowo w Asystencie użytkownika i/lub Podręczniku użytkownika systemów cobas® 6800/8800. Rys. 3 podsumowuje tę procedurę.

- Przed otwarciem probówek i załadowaniem próbek do systemów cobas® 6800/8800 zaleca się oddzielić pozostałości komórek i macierzy, odwirowując próbkę przez maksymalnie 1 minutę z maksymalną siłą odśrodkową (RCF) $3000 \times g$.
- Jeden cykl pracy może obejmować różne materiały próbki (surowa płwocina, próbki w postaci osadu).

Uwaga: jeśli próbki były przechowywane przez ponad 1 godzinę po sonikacji a przed wirowaniem, należy je mieszać na mieszadło wirowym przez co najmniej 10 sekund.

Uwaga: pominięcie etapu wirowania może spowodować zwiększenie występowania skrzepów próbki w systemach cobas® 6800/8800.

Rys. 3 Procedura testu cobas® MTB-RIF/INH w systemach cobas® 6800/8800

1	Zaloguj się do systemu Naciśnij przycisk Start, aby przygotować system. Złóż testy - Wybierz opcję „Raw sputum” (Surowa płwocina), aby złożyć test próbek surowej płwociny poddanych działaniu odczynnika MIS - Wybierz opcję „Sediment” (Próbka w postaci osadu), aby złożyć test próbek w postaci osadu z płwociny / osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) poddanych działaniu odczynnika MIS
2	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: - Ładuj swoistą dla testu kasę odczynnikową - Ładuj kasę z kontrolami - Ładuj końcówki pipetujące - Ładuj płytki do przetwarzania - Ładuj odczynnik MGP Reagent - Ładuj płytki amplifikacyjne - Uzupełnij rozcieńczalnik próbki - Uzupełnij odczynnik lizujący - Uzupełnij odczynnik do mycia
3	Ładuj próbki do systemu - Dotyczy każdej próbki - Otwórz probówkę - Przenieś probówkę na statyw - Ładuj ramkę na próbki i statyw na niedrożne końcówki do modułu podajnika próbek - Potwierdź, że próbki zostały przyjęte do modułu transferu
4	Rozpocznij cykl pracy
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówki z próbkami spełniające wymogi dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść urządzenie - Wyjmij puste kasę z kontrolami - Opróżnij szufladę na płytki do amplifikacji - Usuń odpady płynne - Usuń odpady stałe

Wyniki

Test **cobas**® MTB-RIF/INH automatycznie wykrywa mutacje powiązane z opornością na rifampicynę i mutacje powiązane z opornością na izoniazyd w przypadku próbek i kontroli, przy czym widoczna jest informacja o ważności testu, jak również poszczególne wyniki docelowe.

Kontrola jakości i ważność wyników w systemie **cobas**® 5800

- Z każdą nową serią zestawu i co 72 godziny przetwarzana jest jedna kontrola ujemna [(-) Ctrl] i jedna kontrola dodatnia [MTB-RIF/INH (+) C]. Wykonywanie kontroli dodatnich i/lub ujemnych można zaplanować częściej, w zależności od procedury laboratorium i/lub miejscowych przepisów.
- W celu zagwarantowania ważności wyników należy sprawdzić w oprogramowaniu systemu **cobas**® 5800 i/lub w raporcie obecność flag oraz powiązane z nimi wyniki.

Wyniki są unieważniane automatycznie przez oprogramowanie **cobas**® 5800 na podstawie uzyskania niepomysłnych wyników kontroli ujemnej lub kontroli dodatniej.

UWAGA: system **cobas**® 5800 zostanie dostarczony ze standardowymi ustawieniami oznaczania zestawu kontroli (dodatnich i ujemnych) z każdym cyklem pracy, ale można go skonfigurować do rzadszego wykonywania kontroli, aż do co 72 godzin, w zależności od procedur laboratorium i/lub miejscowych przepisów. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z inżynierem serwisu firmy Roche i/lub pomocą techniczną firmy Roche.

Wyniki kontroli w systemie **cobas**® 5800

Wyniki kontroli przedstawia aplikacja „Controls” oprogramowania **cobas**® 5800.

- Kontrole oznaczone są „Valid” (Ważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie sekwencje docelowe kontroli zostały zgłoszone jako ważne. Kontrole oznaczone są „Invalid” (Nieważne) w kolumnie „Control result”, jeśli jedna lub wszystkie sekwencje docelowe kontroli zostały zgłoszone jako nieważne.
- Kontrole oznaczone jako „Invalid” w kolumnie „Flags” (Flagi) oznaczone są flagą. Więcej informacji na temat powodu zgłoszenia kontroli jako nieważnej, włącznie z informacją o fladze, dostępnych jest w widoku szczegółowym.
- Jeśli jedna z kontroli jest nieważna, należy powtórzyć oznaczenie wszystkich kontroli i powiązanych z nimi próbek.

Kontrola jakości i ważność wyników w systemach **cobas**® 6800/8800

- Jedna kontrola ujemna [(-) Ctrl] i jedna kontrola dodatnia [MTB-RIF/INH (+) C] są przetwarzane z każdą partią badaną pod kątem zleconego typu wyniku.
- W celu zagwarantowania ważności serii należy sprawdzić w oprogramowaniu **cobas**® 6800/8800 i/lub w raporcie obecność flag oraz przypisanych do nich wyników.
- Wszystkie flagi opisano w Asystencie użytkownika i/lub Przewodnikach użytkownika systemów **cobas**® 6800/8800.

- Seria jest ważna, jeśli nie ma oflagowań dla którejkolwiek kontroli. Jeśli seria zostanie unieważniona, należy powtórzyć badanie całej serii.

Walidacja wyników przeprowadzona zostanie automatycznie przez oprogramowanie systemów cobas® 6800/8800 na podstawie uzyskania wyników kontroli ujemnej i dodatniej.

Interpretacja wyników

Tabela 15 Wyniki testu cobas® MTB-RIF/INH i ich interpretacja

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretacja
INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Negative	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Nie wykryto mutacji powiązanych z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretacja
INH Positive	RIF 1 Positive	Invalid	Invalid	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	Invalid	RIF 2 Positive	Invalid	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	Invalid	Invalid	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Negative	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	Invalid	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Negative	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	Invalid	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	Invalid	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	Invalid	Invalid	Invalid	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami.

Target 1	Target 2	Target 3	Target 4	Interpretacja
Invalid	RIF 1 Positive	Invalid	Invalid	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	Invalid	RIF 2 Positive	Invalid	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	Invalid	Invalid	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	Invalid	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	Invalid	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	Invalid	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	RIF 1 Positive	RIF 2 Positive	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
INH Positive	RIF 1 Negative	Invalid	RIF 3 Positive	Wynik dla INH jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na INH. Wynik dla RIF jest ważny. Wykryto mutację(-e) powiązaną(-e) z opornością na RIF.
Invalid	Invalid	Invalid	Invalid	Wynik dla INH jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami. Wynik dla RIF jest nieważny. Zapoznać się z powyższymi instrukcjami.

Interpretacja wyników w systemie cobas® 5800

Wyniki próbek przedstawia aplikacja „Results” oprogramowania **cobas® 5800**.

W przypadku ważnej serii kontroli należy sprawdzić w oprogramowaniu systemu **cobas® 5800** i/lub raportach poszczególne próbki pod kątem obecności flag. Wyniki należy interpretować w następujący sposób:

- Próbkę powiązaną z ważną serią kontroli wyświetlane są jako „Valid” (Ważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako ważne. Próbkę powiązaną z błędną serią kontroli wyświetlane są jako „Invalid” (Nieważne) w kolumnie „Control result”, jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako nieważne.
- Jeśli powiązane kontrole wyniku próbki są nieważne, do wyniku próbki zostanie dodana określona flaga:
 - Q05D: niepowodzenie walidacji wyniku z powodu nieważnej kontroli dodatniej
 - Q06D: niepowodzenie walidacji wyniku z powodu nieważnej kontroli ujemnej
- Wartości w kolumnie „Results” (Wyniki) dla poszczególnych wyników docelowych próbek powinny być interpretowane zgodnie z tym, co przedstawia Tabela 15 powyżej.

Jeśli przynajmniej jedna wartość docelowa próbki jest oznaczona „Invalid” (Nieważny), oprogramowanie **cobas® 5800** wyświetla flagę w kolumnie „Flags” (Flagi). Więcej informacji na temat powodu zgłoszenia wartości docelowej próbki jako nieważnej, włącznie z informacją o fladze, dostępnych jest w widoku szczegółowym.

Rys. 4 Przykładowe wyniki testu **cobas® MTB-RIF/INH** w systemie **cobas® 5800**

Sample ID	Test	Control result	Flag	Status	Result				Creation date/time
MRI_RS_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_RS_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_neg-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Negative	7/1/2022 11:45:20 AM
MRI_RS_pos-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 41.56)	RIF1 Positive (Ct 40.12)	RIF2 Positive (Ct 41.08)	RIF3 Positive (Ct 40.38)	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_RS_pos-02	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Positive (Ct 40.22)	RIF1 Positive (Ct 42.00)	RIF2 Positive (Ct 42.78)	RIF3 Positive (Ct 42.77)	7/1/2022 11:45:19 AM
MRI_S_inv-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Invalid	RIF1 Invalid	RIF2 Invalid	RIF3 Invalid	7/1/2022 11:45:18 AM
MRI_S_neg-01	MTB-RIF/INH	Valid		Released	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Negative	INH Negative	7/1/2022 11:45:18 AM

Interpretacja wyników w systemach cobas® 6800/8800

W przypadku ważnej partii należy sprawdzić w oprogramowaniu systemów **cobas®** 6800/8800 i/lub raportach poszczególne próbki pod kątem obecności flag. Wyniki należy interpretować w następujący sposób:

- Ważna seria może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki próbek.
- Kolumny „Valid” (Ważny) i „Overall Result” (Wynik ogólny) nie dotyczą (NA) wyników próbek testu **cobas®** MTB-RIF/INH i są oznaczone tekstem „NA”. Wartości podane w tych kolumnach nie dotyczą testu i **nie** wpływają na ważność wyników podanych w poszczególnych kolumnach wyników „Target”.
- Podane wyniki docelowe dla poszczególnych próbek są ważne, o ile nie zostały oznakowane jako „Invalid” (Nieważny) w poszczególnych kolumnach wyniku materiału docelowego. Należy pamiętać, że podlegające zgłoszeniu wyniki dotyczące mutacji powiązanych z opornością na RIF mogą obejmować jeden lub dwa nieważne wyniki dotyczące poszczególnych sekwencji docelowych, o czym informuje Tabela 15.
- Może występować więcej niż jedna mutacja powiązana z opornością na RIF i te mutacje mogą zostać wykryte w jednym z kanałów detekcyjnych RIF (Target 2 (Docelowy 2), Target 3 (Docelowy 3), Target 4 (Docelowy 4)). Test **cobas®** MTB-RIF/INH nie rozróżnia konkretnych mutacji powiązanych z opornością na RIF.
- Może występować więcej niż jedna mutacja powiązana z opornością na INH i te mutacje mogą zostać wykryte w kanale detekcyjnym INH (Target 1 (Docelowy 1)). Test **cobas®** MTB-RIF/INH nie rozróżnia konkretnych mutacji powiązanych z opornością na INH.
- Test **cobas®** MTB-RIF/INH jest automatycznym testem referencyjnym stosowanym z testem **cobas®** MTB i jako taki polega na wykrywaniu DNA kompleksu MTB typu dzikiego celem monitorowania całego procesu przygotowania próbki oraz amplifikacji PCR. Test **cobas®** MTB różni się od testu **cobas®** MTB-RIF/INH tym, że z większą czułością wykrywa DNA kompleksu MTB, co jest spowodowane wykrywaniem dwóch sekwencji docelowych, z których jedna występuje w wielu kopiach genomowych. Dlatego w niektórych przypadkach, gdy nie są wykrywane prątki MTB ani mutacje powiązane z konkretną opornością, obecności lub braku mutacji powiązanych z opornością nie można określić za pomocą testu **cobas®** MTB-RIF/INH (wynik „Invalid” (Nieważny) w odpowiedniej kolumnie dotyczącej wyniku dla sekwencji docelowej, Tabela 15). Jeśli do tego dojdzie:
 - Należy sprawdzić powiązane flagi. Flagi „C02H1-H5”, przy braku innych flag, wskazują na niewystarczającą ilość DNA kompleksu MTB.
 - Należy wykonać ponowny test inaktywowanej próbki, pod warunkiem że dostępna jest jej wystarczająca objętość (zgodnie z wytycznymi, które zawiera Tabela 14) i pod warunkiem że inaktywowana próbka była przechowywana według wytycznych z sekcji „Przechowywanie próbek inaktywowanych” — w razie niespełnienia tych warunków należy wykonać ponowny test, używając nowej, świeżej próbki.
 - Należy rozważyć zwiększenie miana bakterii *M. tuberculosis* poprzez powiększenie hodowli albo stosowanie metod alternatywnych, jeśli dla tego samego pacjenta stale uzyskiwane są nieważne wyniki.
- Wyniki tego testu powinny być interpretowane wyłącznie w połączeniu z informacjami pochodzącymi z oceny klinicznej pacjenta i jego historii choroby.

Wyniki i ich odpowiednią interpretację dotyczącą wykrycia mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę i mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd zawiera Tabela 15.

Rys. 5 Przykładowe wyniki testu **cobas®** MTB-RIF/INH w systemach **cobas®** 6800/8800

Test	Sample ID	Valid	Flags	Sample type	Overall result	Target 1	Target 2	Target 3	Target 4
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0001	NA		Raw Sputum	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0002	NA		Raw Sputum	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_R_0003	NA	P02T	Raw Sputum	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0001	NA		Sediment	NA	INH Negative	RIF1 Negative	RIF2 Positive	RIF3 Negative
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0002	NA		Sediment	NA	INH Positive	RIF1 Negative	RIF2 Negative	RIF3 Positive
MTB-RIF/INH 850 µL	MDR_sample_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid	Invalid	Invalid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid
MTB-RIF/INH 850 µL	C161420284093009580264	Yes		MTB-RIF/INH (+) C	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Ograniczenia metody

- Test **cobas®** MTB-RIF/INH musi być zawsze wykonywany jednocześnie z hodowlą prątków i testami lekowrażliwości oraz jako automatyczny test referencyjny stosowany w połączeniu z testem **cobas®** MTB (próbki oznaczone jako dodatnie w teście **cobas®** MTB), aby zminimalizować ryzyko wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub wyników nieważnych. Działanie testu **cobas®** MTB-RIF/INH zostało zweryfikowane dla próbek surowej płwociny oraz próbek w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), które zostały upłynnione, odkażone i zatężone przy użyciu NALC-NaOH. Stosowanie innych typów próbek może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub nieważnych. Trawienie i dekontaminację należy przeprowadzać z zastosowaniem procedur wykorzystujących NALC-NaOH zalecanych przez agencję CDC.¹⁵ Stosowanie alternatywnych procedur przedanalizy przygotowania próbek może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub nieważnych.
- Test **cobas®** MTB-RIF/INH został zatwierdzony do stosowania z próbkami surowej płwociny oraz poddanymi działaniu NALC-NaOH próbkami w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), inaktywowanymi chemicznie za pomocą odczynnika MIS. Inne procedury inaktywacji nie zostały ocenione, dlatego mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub nieważnych.
- Skuteczna inaktywacja prątków gruźlicy zależy od przestrzegania procedur opisanych w niniejszym dokumencie oraz od całkowitego wymieszania próbki z odczynnikiem MIS. Upłynnianie próbek oraz inaktywację prątków przez MIS należy przeprowadzać zgodnie z wytycznymi lub przepisami miejscowymi i obowiązującymi w danej instytucji oraz w oparciu o stosowną ocenę ryzyka.

- Przekroczenie ograniczeń dotyczących objętości i/lub odstępstwa od etapów procedury określonych w częściach „Przetwarzanie próbek surowej płwociny”, „Przetwarzanie próbek w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)” oraz „Sonikacja próbek” mogą prowadzić do uzyskania wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych i/lub nieważnych.
- Testy z wykorzystaniem amplifikacji kwasu nukleinowego nie umożliwiają określenia żywotności drobnoustrojów.
- Niniejszego testu nie wolno używać do oceny skuteczności lub nieskuteczności leczenia przeciwgruźliczego.
- Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemów **cobas® 5800/6800/8800**.
- Test **cobas® MTB-RIF/INH** został oceniony jedynie pod kątem stosowania z zestawami **cobas® MTB-RIF/INH Positive Control Kit** i **cobas® Buffer Negative Control Kit** oraz odczynnikami **cobas® omni MGP Reagent**, **cobas® omni Lysis Reagent**, **cobas® omni Specimen Diluent** i **cobas® omni Wash Reagent** do użytku z systemami **cobas® 5800/6800/8800**, odczynnikiem **MIS** i sonikatorem do probówek **TS 5** firmy **Rinco Ultrasonics AG**.
- Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od prawidłowych procedur pobierania, przechowywania i dalszego postępowania z próbkami.
- Test **cobas® MTB-RIF/INH** nie jest przeznaczony do stosowania z próbkami z dróg oddechowych jako test potwierdzający wyleczenie.
- Test **cobas® MTB-RIF/INH** nie rozróżnia poszczególnych gatunków prątków należących do kompleksu **MTB**.
- Wykrywanie mutacji powiązanych z opornością na rifampicynę i mutacji powiązanych z opornością na izoniazyd zależy od ilości obecnych w próbce drobnoustrojów należących do kompleksu **MTB**. Na wykrywanie mogą mieć wpływ metody pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, nasilenie choroby, status zakażenia wirusem **HIV**).
- U pacjentów zakażonych zarówno prątkami **MTB**, jak i wirusem **HIV**, występuje większe prawdopodobieństwo ujemnego wyniku badania rozmazu próbki, co wiąże się z występowaniem prątków kompleksu **MTB** w ilości poniżej granicy wykrywalności testu.
- Pracownicy opieki zdrowotnej muszą interpretować wyniki z uwzględnieniem wywiadu pacjenta, objawów klinicznych, a także wyników innych badań laboratoryjnych i radiograficznych.
- Wyniki fałszywie ujemne lub nieważne mogą się pojawiać na skutek hamowania polimerazy. Wykrycie DNA kompleksu **MTB** w próbce jest przewidziane jako kontrola wewnętrzna testu **cobas® MTB-RIF/INH**, która sprawdza, czy próbka zawiera wystarczającą ilość DNA kompleksu **MTB**.
- Dodanie do Master Mixu testu **cobas® MTB-RIF/INH** enzymu **AmpErase** umożliwia selektywną amplifikację docelowego DNA; jednak dla uniknięcia zanieczyszczenia odczynników konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji użytkowania.
- Choć zdarza się to rzadko, mutacje powiązane z opornością mogą nie być wykrywane, jeśli w niewielkiej odległości od nich znajdują się dodatkowe mutacje.

- Z uwagi na różnice pomiędzy metodami zaleca się, aby przed zmianą użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących pomiędzy nimi różnic jakościowych. Ze względu na wspomniane wyżej różnice w metodach nie należy oczekiwać stuprocentowej zgodności między wynikami.
- Użycie probówek innych od zalecanych (patrz Tabela 10) musi zostać zweryfikowane przez użytkownika przed wprowadzeniem do procedury cobas® MTB-RIF/INH w laboratorium. Użycie innych typów probówek może spowodować ich uszkodzenie i zanieczyszczenie powierzchni sonikatora. Możliwe jest też uzyskanie wyników fałszywie ujemnych wskutek niewystarczającego przenoszenia energii sonikacji.
- Użycie etykiet z kodem kreskowym innych od zalecanych (patrz Tabela 10) musi zostać zweryfikowane przez użytkownika przed wprowadzeniem do procedury cobas® MTB-RIF/INH w laboratorium. Użycie innych rodzajów kodów kreskowych może skutkować ich uszkodzeniem.

Ocena wiarygodności

Najważniejsze parametry działania wykonywanego w systemach cobas® 6800/8800

Inaktywacja próbek

Zmniejszenie ryzyka zakażenia prątkami MTB w drodze poddania próbek działaniu MIS oceniano przy użyciu wysoko dodatnich hodowli dwóch szczepów kompleksu MTB (MTB CDC268 i MTB H37) w trzech różnych ośrodkach i przy zastosowaniu trzech różnych partii odczynnika MIS. Dla każdego warunku pięć alikwotów hodowli o stężeniu do 5×10^7 CFU/mL poddano działaniu odczynnika MIS w stosunku 1:2 przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki poddano odwirowaniu przez 15 minut przy $3000 \times g$, dwukrotnie przemyto jałowym PBS, a na końcu zawieszono ponownie w 0,5 ml jałowego PBS. W dwóch ośrodkach całą inaktywowaną próbkę inokulowano i zbadano pod kątem wzrostu z zastosowaniem BACTEC™ MGIT™ 320 Mycobacterial Detection System (Becton Dickinson). W trzecim ośrodku zbadano żywotność MTB na stałym podłożu Löwensteina-Jensena (LJ). W żadnej z inaktywowanych próbek nie stwierdzono wzrostu bakterii kompleksu *M. tuberculosis* pod koniec 56-dniowego okresu inkubacji.

Granica wykrywalności (LoD)

Granice wykrywalności dla testu cobas® MTB-RIF/INH określono poprzez analizę seryjnych rozcieńczeń zmutowanych szczepów kompleksu MTB, które zawierały najbardziej rozpowszechnioną mutację S531L powiązaną z opornością na rifampicynę (gen *rpoB*) i najbardziej rozpowszechnioną mutację S315T powiązaną z opornością na izoniazyd (gen *katG*) w dwóch zbiorczych ujemnych macierzach klinicznych — surowej płwocinie oraz osadzie z płwociny / osadzie z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL). Panele zawierające od dziesięciu do jedenastu poziomów stężeń oraz próbkę ślepą były testowane łącznie w 72 powtórzeniach dla każdego stężenia i typu próbki przy użyciu trzech serii odczynników testu cobas® MTB-RIF/INH w wielu przebiegach, w różnych dniach oraz z użyciem wielu aparatów obsługiwanych przez różnych operatorów.

Granica wykrywalności (LoD) dla bakterii *M. tuberculosis* opornych na RIF wynosiła od 94,0 CFU/ml (osad z płwociny / osad z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)) do 182 CFU/ml (surowa płwocina).

Granica wykrywalności (LoD) dla bakterii *M. tuberculosis* opornych na INH wynosiła od 12,6 CFU/ml (osad z płwociny / osad z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)) do 27,5 CFU/ml (surowa płwocina).

Heterooporność

Zdolność wykrywania zmutowanych prątków MTB w zakażeniu mieszanym z MTB typu dzikiego potwierdzono, wykonując testy z różnymi stosunkami prątków zmutowanych do prątków typu dzikiego. Bardzo niskie stężenia ($\sim 3 \times \text{LoD}$) izolatu z hodowli prątków MDR-TB w tle zawierającym do 60% MTB typu dzikiego są wykrywane przez test cobas® MTB-RIF/INH w próbkach surowej płwociny i próbkach osadu z płwociny oraz osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL).

Inkluzywność w odniesieniu do mutacji powiązanych z opornością

Inkluzywność w odniesieniu do mutacji genu *rpoB* powiązanych z opornością na rifampicynę oraz mutacji genu *katG* i regionu promotorowego genu *inhA* powiązanych z opornością na izoniazyd w drobnoustrojach z kompleksu MTB sprawdzono, testując hodowle podstawowe należących do kompleksu MTB szczepów opornych na rifampicynę i/lub izoniazyd, które zawierały 23 poniższe mutacje:

- Mutacje genu *rpoB* powiązane z fenotypową opornością na rifampicynę:
 - L511P
 - Q513K, Q513L, Q513P
 - D516V, D516Y
 - S522L, S522Q
 - H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y
 - S531L, S531W
 - L533P
- Mutacje genu *katG* i mutacje regionu promotorowego genu *inhA* powiązane z fenotypową opornością na izoniazyd:
 - Gen *katG*:
 - S315I, S315N, S315T, S315T2
 - Region promotorowy genu *inhA*:
 - T-8A, T-8C
 - C-15T

Wszystkie mutacje wykryto przy stężeniu 545 CFU/ml w próbkach surowej płwociny i stężeniu 282 CFU/ml w próbkach osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL).

Inkluzywność w odniesieniu do dwóch innych mutacji genu *rpoB* powiązanych z opornością na rifampicynę — S522W i D516G — sprawdzono, badając plazmidy; obie te mutacje wykryto przy stężeniu 77 kopii/ml.

Swoistość w odniesieniu do kompleksu MTB typu dzikiego

Swoistość analityczną w odniesieniu do kompleksu MTB typu dzikiego sprawdzono, badając 13 szczepów MTB w wysokich stężeniach ($\sim 1,00 \times 10^4$ CFU/ml) w próbkach surowej płwociny i próbkach osadu z płwociny oraz osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), a także następujące szczepy kompleksu MTB w niskich stężeniach ($\sim 3 \times \text{LoD}$) w próbkach w postaci osadu:

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC® 25177™)
- *M. bovis* BCG (podszczep japoński Tokyo 172 NIBSC 07/272 WHO i podszczep rosyjski Moscow NIBSC 07/274 WHO)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* subsp. *bovis* (ATCC® 19210™)
- *M. canetti* (NLA 000016778)
- *M. caprae* (ATCC® BAA-824™)
- *M. microti* (ATCC® 19422™)
- *M. orygis* (NLA 001300863)
- *M. pinnipedii* (ATCC® BAA-688™)

W przypadku wszystkich szczepów typu dzikiego uzyskano ważne wyniki ujemne pod kątem mutacji powiązanych z opornością na RIF i INH.

Precyzja

Wewnętrzne badanie precyzji przeprowadzono przy użyciu panelu zawierającego wyhodowany zmutowany szczep kompleksu MTB, który zawierał najbardziej rozpowszechnioną mutację S531L powiązaną z opornością na rifampicynę (gen *rpoB*) i najbardziej rozpowszechnioną mutację S315T powiązaną z opornością na izoniazyd (gen *katG*), po rozcieńczeniu w dwóch zbiorczych ujemnych macierzach klinicznych — surowej płwocinie oraz osadzie z płwociny / osadzie z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL). Źródła zmienności zbadano przy użyciu paneli obejmujących trzy poziomy stężenie (w tym próbkę ślepą) przy użyciu trzech serii odczynników testu cobas® MTB-RIF/INH oraz dwóch aparatów, w ciągu 12 dni, w ramach łącznie 24 przebiegów. Opis paneli do oceny precyzji oraz zaobserwowane odsetki wyników dodatnich przedstawia Tabela 16. Wszystkie elementy paneli ujemnych w testach pozostały ujemne. Analiza odchylenia standardowego i procentowego współczynnika zmienności wartości Ct z testów przeprowadzonych na elementach panelu dodatniego (patrz Tabela 17) doprowadziła do uzyskania ogólnych zakresów wartości CV (%) wynoszących od 1,8% do 2,7% dla wykrywania mutacji powiązanych z opornością na INH oraz od 1,5% do 2,1% dla wykrywania mutacji powiązanych z opornością na RIF.

Tabela 16 Podsumowanie precyzji wewnątrzlaboratoryjnej

Docelowe stężenie	Liczba testowanych	Liczba wyników dodatnich	Odsetek wyników dodatnich	95% przedział ufności	
				Dolna granica	Górny limit
M. tuberculosis — surowa płwocina do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na RIF					
Ujemny	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
182 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
545 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
M. tuberculosis — próbki w postaci osadu do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na RIF					
Ujemny	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
94,0 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
282 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
M. tuberculosis — surowa płwocina do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na INH					
Ujemny	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
27,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
82,5 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%
M. tuberculosis — próbki w postaci osadu do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na INH					
Ujemny	48	0	0,0%	0,0%	7,4%
12,6 CFU/ml	48	47	97,9%	88,9%	99,9%
37,8 CFU/ml	48	48	100%	92,6%	100%

Tabela 17 Łączne wartości średnie, odchylenia standardowe i współczynniki zmienności (%) dla wartości progowej cyklu — dodatnie panele MTBC

Docelowe stężenie	Odsetek wyników dodatnich	Średnia wartość Ct	W obrębie cyklu pracy		Między cyklami pracy		Między dniami		Między urza- dzeniami		Między seriami		Ogółem	
			OS	CV%	OS	CV%	OS	CV%	OS	CV%	OS	CV%	OS	CV%
M. tuberculosis — surowa plwocina do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na RIF														
182 CFU/ml	100%	37,3	0,48	1,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	0,59	1,6
545 CFU/ml	100%	35,6	0,40	1,1	0,00	0,0	0,29	0,8	0,00	0,0	0,24	0,7	0,55	1,5
M. tuberculosis — próbki w postaci osadu do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na RIF														
94,0 CFU/ml	100%	39,3	0,36	0,9	0,14	0,3	0,45	1,1	0,00	0,0	0,42	1,1	0,72	1,8
282 CFU/ml	100%	38,0	0,40	1,0	0,12	0,3	0,54	1,4	0,41	1,1	0,00	0,0	0,80	2,1
M. tuberculosis — surowa plwocina do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na INH														
27,5 CFU/ml	100%	37,5	0,74	2,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,17	0,5	0,00	0,0	0,82	2,2
82,5 CFU/ml	100%	35,9	0,52	1,5	0,00	0,0	0,43	1,2	0,31	0,9	0,00	0,0	0,74	2,1
M. tuberculosis — próbki w postaci osadu do wykrywania docelowych sekwencji mutacji powiązanych z opornością na INH														
12,6 CFU/ml	97,9%	39,4	0,75	1,9	0,66	1,7	0,00	0,0	0,34	0,9	0,00	0,0	1,06	2,7
37,8 CFU/ml	100%	37,5	0,56	1,5	0,00	0,0	0,00	0,0	0,31	0,8	0,15	0,4	0,66	1,8

Swoistość analityczna / reaktywność krzyżowa

Panel składający się ze 145 bakterii, grzybów i wirusów (łącznie z tymi, które powszechnie występują w układzie oddechowym) poddano badaniu testem **cobas**® MTB-RIF/INH, aby ocenić swoistość analityczną i zdolność wykrywania niskich stężeń szczepów MTB zmutowanych i dzikich w obecności innych drobnoustrojów. Drobnoustroje, które wymienia Tabela 18 dodano w stężeniach wynoszących około 1×10^6 jednostek/ml dla bakterii i około 1×10^5 jednostek/ml dla wirusów. Testy wykonano z poszczególnymi drobnoustrojami potencjalnie zakłócającymi przy braku i obecności docelowego zmutowanego szczepu z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu 282 CFU/ml) oraz docelowego szczepu typu dzikiego z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu 200 CFU/ml). Żaden z drobnoustrojów nie wpływał na skuteczność testu przez generowanie wyników fałszywie dodatnich. Na wykrycie zmutowanego docelowego szczepu z kompleksu MTB w niskich stężeniach nie wpłynęła obecność badanych drobnoustrojów z wyjątkiem *M. asiaticum*, *M. fuerth*, *M. intermedium*, *M. marseillense*, *M. peregrinum* i *M. szulgai* w stężeniach $> 1 \times 10^5$ CFU/ml i *M. chubuense* w stężeniach $> 1 \times 10^4$ CFU/ml. Na wykrycie docelowego szczepu typu dzikiego z kompleksu MTB w niskich stężeniach nie wpłynęła obecność badanych drobnoustrojów z wyjątkiem *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. colombiense*, *M. gastri*, *M. lentiflavum* i *M. marinum* w stężeniach $> 1 \times 10^5$ CFU/ml oraz *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. bouchedurhonense* i *M. vulneris* w stężeniach $> 1 \times 10^4$ CFU/ml. Potencjalną reaktywność krzyżową z drobnoustrojami *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium mantenii* i *Mycobacterium timonense* oceniono *in silico*. Zgodnie z przewidywaniami na podstawie wyników analiz *in silico* prawdopodobieństwo amplifikacji i detekcji tych drobnoustrojów podczas stosowania testu **cobas**® MTB-RIF/INH jest niskie.

Tabela 18 Drobnoustroje badane pod kątem swoistości analitycznej/reaktywności krzyżowej

Drobnoustrój	Stężenie	Drobnoustrój	Stężenie
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces israelii</i>	8,5E+05 CFU/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Adenovirus</i>	1,0E+05 kopii/ml	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bactericides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamontense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium malmoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marseillense</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vulneris</i>	1,0E+04 CFU/ml*
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium yongonense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 CCU/ml
<i>Escherichia coli</i> wytwarz. ESBL CTX-M-15	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus upośledzenia odporności	1,0E+05 kopii/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
Ludzki wirus grypy typu A	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus grypy typu B	1,0E+05 U/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki metapneumowirus	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
Ludzki wirus grypy rzekomej typu 1	1,0E+05 U/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus grypy rzekomej typu 2	1,0E+05 U/ml	<i>Penicillium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus grypy rzekomej typu 3	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus grypy rzekomej typu 4	1,0E+05 U/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki wirus syncytium nabłonka oddechowego typu A	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml

Drobnoustrój	Stężenie	Drobnoustrój	Stężenie
Ludzki wirus syncytium nabłonka oddechowego typu B	1,0E+05 U/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Ludzki rhinowirus	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> wytwarzająca karbapenemazę KPC-3	1,0E+06 CFU/ml	<i>Wirus różyczki</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Wirus odry (rubeola)</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Rubulavirus</i>	1,0E+05 U/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium arosiense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bouchardurhonense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+04 CFU/ml*	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium colombiense</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium confluentis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Wirus ospy wietrznej</i>	1,0E+05 kopii/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+05 CFU/ml*	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium gastri</i>	1,0E+05 CFU/ml*	-	-

* Poziom, przy którym nie zaobserwowano zakłóceń wykrywania *M. tuberculosis*, testowany również przy stężeniu 1,0E+06 CFU/ml, przy którym wykazano zakłócenia.

Substancje wpływające na wynik testu

Oceniono działanie substancji egzogennych potencjalnie wydzielanych do próbek z układu oddechowego (Tabela 19). Każdą potencjalnie zakłócającą substancję zbadano w stężeniu klinicznie istotnym lub większym w spreparowanych próbkach płwociny przy braku i w obecności docelowego zmutowanego szczepu z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu 545 CFU/ml) i docelowego szczepu typu dzikiego z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu 200 CFU/ml).

Żadna z substancji nie wpływała na skuteczność testu przez generowanie wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Żadna z substancji nie wpływała na skuteczność testu poprzez generowanie wyników nieważnych / niekwalifikujących się do zgłoszenia z wyjątkiem lepieźnika w stężeniu > 25 mg/ml.

Tabela 19 Lista egzogennych substancji testowanych pod kątem interferencji

Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie
Siarczan albuterolu	0,5 µg/ml	Jednosiarczan kanamycyny	240 µg/ml
Amikacyna	80,1 µg/ml	Lewofloksacyna	5 mg/ml
Amoksycylina	86,4 µg/ml	Lidokaina HCl	1,2% (wag./obj.)
Beklometazon	3459 pg/ml	Mentol	0,50% (wag./obj.)
Benzokaina	1,2% (wag./obj.)	Salicylan metylu	0,06% (udział objętościowy)
Budezonid	3 mg/ml	Mometazon	100 µg/ml
Ekstrakt z lepieźnika	25 mg/ml*	Moksyfloksacyna	15 µg/ml
Kapreomycyna	80 µg/ml	Mupirocyna	0,05% (wag./obj.)
Chlorek cetylopirydyniowy	0,5% (wag./obj.)	NaCl	5% (wag./obj.)
Glukonian chlorheksydyny	1% (udział objętościowy)	Nikotyna	1 µg/ml
Cykloseryna	105 µg/ml	Nystatyna	1% (udział objętościowy)
Klarytromycyna	20 µg/ml	Oksymetazolina	12 ng/ml
deksametazon	601 ng/ml	Pentamidyna	1366 ng/ml
Chlorowodorek efedryny	1 mg/ml	Fenylefryna	5 mg/ml
Epinefryna	100 pg/ml	Prednizolon	3 µg/ml
Etambutol	50 µg/ml	Pirazynamid	240 µg/ml
Etionamid	15 µg/ml	Rifampicyna	25 µg/ml
Eukaliptol	0,002% (udział objętościowy)	Ekstrakt z pokrzywy zwyczajnej (500 mg)	5 mg/ml
Flunizolid	400 µg/ml	Streptomycyna	240 µg/ml
Propionian flutykazonu	5 µg/ml	Siarka	0,01% (wag./obj.)
Dwuwodny fumaran formoterolu	66 µg/ml	Olejek z drzewa herbacianego	0,50% (udział objętościowy)
Korzeń gorzknika kanadyjskiego (kapsułki 570 mg)	5,7 mg/ml	Teofilina	20 µg/ml
Gwajafenezyna	2,5 mg/ml	Tobramycyna	24,1 µg/ml
Izoniazyd	50 µg/ml	Zanamiwir	0,1 mg/ml

* Najwyższy poziom, przy którym nie zaobserwowano zakłóceń

Zbadano pod kątem zakłóceń substancje endogenne, które mogą występować w próbkach z układu oddechowego (Tabela 20). Każdą potencjalnie zakłócającą substancję zbadano w stężeniu klinicznie istotnym lub większym w spreparowanych próbkach płwociny przy braku i w obecności docelowego zmutowanego szczepu z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu do 545 CFU/ml) i docelowego szczepu typu dzikiego z kompleksu MTB (dodanego w stężeniu 200 CFU/ml).

Żadna z substancji nie wpływała na skuteczność testu przez generowanie wyników fałszywie ujemnych, fałszywie dodatnich lub nieważnych/niekwalifikujących się do zgłoszenia.

Tabela 20 Lista endogennych substancji testowanych pod kątem interferencji

Substancja	Stężenie	Substancja	Stężenie
Sok żołądkowy	10% (udział objętościowy)	Śluz	5% (wag./obj.)
Hemoglobina	2 g/l	Ropa	5% (udział objętościowy)
Ludzka krew pełna	5% (udział objętościowy)	Ślina	10% (udział objętościowy)
hDNA	4 mg/l	-	-

Błąd całego systemu

Próbkami badanymi w teście błędu całego systemu były spreparowane próbki płwociny i osadu z płwociny, do których dodano zmutowany szczep z kompleksu MTB z najbardziej rozpowszechnioną mutacją S531L powiązaną z opornością na rifampicynę (gen *rpoB*) i najbardziej rozpowszechnioną mutacją S315T powiązaną z opornością na izoniazyd (gen *katG*) do stężenia około $3 \times \text{LoD}$ testu **cobas**® MTB-RIF/INH dla poszczególnych rodzajów macierzy. Wszystkie 100 powtórzeń testów na typ próbki były ważne i dodatnie pod względem obecności prątków należących do kompleksu MTB, co skutkowało uzyskaniem częstości występowania błędu całego systemu na poziomie 0,0% przy górnym, jednostronnym 95% przedziale ufności wynoszącym 3,0%.

Skażenie krzyżowe

Ustalono, że odsetek kontaminacji między próbkami wynosi 0,0% (0/240) przy naprzemiennym testowaniu wysoko dodatnich próbek szczepu typu dzikiego należącego do kompleksu MTB i próbek ujemnych badanych w wielu przebiegach testem **cobas**® MTB. Testy przeprowadzono, używając spreparowanych próbek w postaci osadu z płwociny, do których dodano docelowy kompleks MTB w stężeniu 2×10^6 CFU/ml. Było to stężenie próbki, dla którego uzyskiwano wartości Ct niższe niż w przypadku 95% próbek od zakażonych pacjentów w populacji docelowej.

Ocena skuteczności przy użyciu próbek klinicznych

Działanie testu **cobas**® MTB-RIF/INH w przypadku stosowania próbek klinicznych oceniono, badając pobrane prospektywnie i zarchiwizowane próbki (surowej płwociny oraz osadu z płwociny poddanego działaniu NALC-NaOH) pobrane w Peru, Ukrainie, Rosji, Republice Południowej Afryki i Ugandzie od osób w wieku co najmniej 18 lat z podejrzeniem zakażenia gruźlicą. Przeprowadzono równoległe badanie porównawcze z wykorzystaniem testu RealTime MTB RIF/INH Resistance firmy Abbott.

Wyniki przedstawia w Tabela 21 i Tabela 22.

Tabela 21 Czułość i swoistość testu **cobas® MTB-RIF/INH** określone przy użyciu próbek klinicznych — oporność na RIF

		Roche cobas® MTB-RIF/INH	Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance
Czułość	Surowa płwocina	116/120 96,7% [91,7–99,1%]	115/120 95,8% [90,5–98,6%]
Czułość	Osad	23/23 100% [85,2–100%]	23/23 100% [85,2–100%]
Czułość	Łącznie	139/143 97,2% [93,0–99,2%]	138/143 96,5% [92,0–98,9%]
Swoistość	Surowa płwocina	331/338 97,9% [95,8–99,2%]	329/338 97,3% [95,0–98,8%]
Swoistość	Osad	219/220 99,5% [97,5–100%]	219/220 99,5% [97,5–100%]
Swoistość	Łącznie	550/558 98,6% [97,2–99,4%]	548/558 98,2% [96,7–99,1%]
Przewidywana wartość dodatnia	Surowa płwocina	116/123 94,3% [88,6–97,7%]	115/124 92,7% [86,7–96,6%]
Przewidywana wartość dodatnia	Osad	23/24 95,8% [78,8–99,9%]	23/24 95,8% [78,8–99,9%]
Przewidywana wartość dodatnia	Łącznie	139/147 94,5% [89,5–97,6%]	138/148 93,2% [87,9–96,7%]
Przewidywana wartość ujemna	Surowa płwocina	331/335 98,8% [97,0–99,7%]	329/334 98,5% [96,6–99,5%]
Przewidywana wartość ujemna	Osad	219/219 100% [98,3–100%]	219/219 100% [98,3–100%]
Przewidywana wartość ujemna	Łącznie	550/554 99,3% [98,3–99,8%]	548/553 99,1% [97,9–99,7%]

Tabela 22 Czułość i swoistość testu **cobas®** MTB-RIF/INH określone przy użyciu próbek klinicznych — oporność na INH

		Roche cobas® MTB-RIF/INH	Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance
Czułość	Surowa płwocina	150/154 97,4% [93,5–99,3%]	147/154 95,5% [90,9–98,2%]
Czułość	Osad	35/37 94,6% [81,8–99,3%]	32/37 86,5% [71,2–95,5%]
Czułość	Łącznie	185/191 96,9% [93,3–98,8%]	179/191 93,7% [89,3–96,7%]
Swoistość	Surowa płwocina	297/299 99,3% [97,6–99,9%]	297/299 99,3% [97,6–99,9%]
Swoistość	Osad	206/207 99,5% [97,3–100%]	206/207 99,5% [97,3–100%]
Swoistość	Łącznie	503/506 99,4% [98,3–99,9%]	503/506 99,4% [98,3–99,9%]
Przewidywana wartość dodatnia	Surowa płwocina	150/152 98,7% [95,3–99,8%]	147/149 98,7% [95,2–99,8%]
Przewidywana wartość dodatnia	Osad	35/36 97,2% [85,5–99,9%]	32/33 97,0% [84,2–99,9%]
Przewidywana wartość dodatnia	Łącznie	185/188 98,4% [95,4–99,7%]	179/182 98,4% [95,3–99,7%]
Przewidywana wartość ujemna	Surowa płwocina	297/301 98,7% [96,6–99,7%]	297/304 97,7% [95,3–99,1%]
Przewidywana wartość ujemna	Osad	206/208 99,0% [96,6–100%]	206/211 97,6% [94,6–99,2%]
Przewidywana wartość ujemna	Łącznie	503/509 98,8% [97,5–99,6%]	503/515 97,7% [96,0–98,9%]

Równoważność/porównanie systemu

Równoważność systemów **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 i **cobas®** 8800 wykazano przez badanie skuteczności. Wyniki przedstawione w instrukcji obsługi potwierdzają równoważne działanie wszystkich systemów.

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy oznaczenia

Typy próbek

- Surowa płwocina
- Poddane działaniu NALC-NaOH próbki w postaci osadu z płwociny i osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL)

Przetwarzana ilość próbki

- $\geq 0,4$ ml próbki pacjenta poddanej działaniu odczynnika MIS w stosunku 1:2 (objętość całkowita $\geq 1,2$ ml) wymagane w probówce na próbkę w przypadku surowej płwociny; urządzenie przetwarza 0,85 ml
- $\geq 0,2$ ml próbki pacjenta poddanej działaniu odczynnika MIS w stosunku 1:5 (objętość całkowita $\geq 1,2$ ml) wymagane w probówce na próbkę w przypadku osadu z płwociny / osadu z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL); urządzenie przetwarza 0,85 ml

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 23 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

 Age/DOB	Wiek lub data urodzenia		Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie	 QS IU/PCR	IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
 SW	Oprogramowanie pomocnicze		Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania	 SN	Numer seryjny
 Assigned Range [copies/mL]	Przypisany zakres (kopie/mL)		Dystrybutor (Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)	 Site	Ośrodek
 Assigned Range [IU/mL]	Przypisany zakres (IU/mL)		Nie używać powtórnie	 Procedure Standard	Procedura standardowa
 EC REP	Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej		Kobieta	 STERILE EO	Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu
 BARCODE	Arkusze kodów kreskowych		Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD		Przechowywać z dala od światła
 LOT	Kod partii	 GTIN	Globalny numer jednostki handlowej		Przestrzegać zakresu temperatury
	Zagrożenie biologiczne		Importer	 TDF	Plik definicji testów
 REF	Numer katalogowy	 IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>		Tą stroną do góry
	Oznaczenie zgodności CE — wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>	 LLR	Dolna granica przypisanego zakresu	 Procedure UltraSensitive	Procedura ultraczuła
 Collect Date	Data pobrania		Mężczyzna	 UDI	Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu
	Sprawdź w instrukcji użytkownika		Wytwórca	 ULR	Górny limit przypisanego zakresu
	Zawartość wystarczająca na <n> testów	 CONTROL -	Kontrola ujemna	 Urine Fill Line	Linia napełniania moczem
 CONTENT	Zawartość zestawu		Wyrób niejałowy	 Rx Only	Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
 CONTROL	Próba kontrolna		Nazwisko pacjenta		Termin przydatności
	Data produkcji		Numer pacjenta		
	Wyrób do testów przy pacjencie		Rozerwać tutaj		
	Wyrób do samodzielnego testowania	 CONTROL +	Kontrola dodatnia		
		 QS copies / PCR	Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.		

Pomoc techniczna

W celu uzyskania wsparcia (pomocy) technicznego należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Wytwórca

Tabela 24 Wytwórca

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych

Znaki towarowe i patenty

Patrz <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Prawo autorskie

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Písmiennictwo

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Sitthidet Tharinjaroen C, Intorasoot S, Anukool U, et al. Novel targeting of the *lepB* gene using PCR with confronting two-pair primers for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis*. *J Med Microbiol*. 2016;65:36-43.
3. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1296-9.
4. Novosad SA, Winthrop KL. Beyond tumor necrosis factor inhibition: the expanding pipeline of biologic therapies for inflammatory diseases and their associated infectious sequelae. *Clin Infect Dis*. 2014;58:1587-98.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Recomm Rep*. 2000;49:1-51.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60:1650-3.
7. Orenstein EW, Basu S, Shah NS, et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:153-61.
8. Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *J Infect Dis*. 2015;211 Suppl 2:S21-8.
9. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8.
10. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7.
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
12. Chosewood LC, Wilson DE, eds. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. US Department of Health and Human Services; 2009.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*. 4th ed. M29-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2014.
14. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
15. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. Centers for Disease Control: Atlanta, GA; 1985.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 2.0 05/2024	Zaktualizowano wskazówki dotyczące bezpieczeństwa biologicznego o adaptację do przepisów miejscowych, dokonano poprawek gramatycznych oraz zamieszczono dane WHO/odniesienie do WHO. Usunięto symbol „Rx Only” z pierwszej strony. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. Przeniesiono „w wieku co najmniej 18 lat” z sekcji Ograniczenia metody do sekcji Ocena skuteczności przy użyciu próbek klinicznych. Zaktualizowano zapis marki cobas®. Zaktualizowano oświadczenie o właściwym organie. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem Roche.

Podsumowanie sprawozdania na temat bezpieczeństwa i parametrów działania można znaleźć pod następującym linkiem:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>