

cobas[®] MAI

Test nukleových kyselin pro použití se systémy cobas[®] 5800/6800/8800

Pro použití k diagnostice *in vitro*

cobas[®] MAI

P/N: 09040595190

Pro použití se systémem cobas[®] 5800

cobas[®] MAI Positive Control Kit

P/N: 09040609190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Pro použití se systémy cobas[®] 6800/8800

cobas[®] MAI Positive Control Kit

P/N: 07544863190 nebo
P/N: 09040609190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 nebo
P/N: 09051953190

Obsah

Účel použití.....	4
Souhrn a výklad testu.....	4
Reagencie a materiály	7
Reagencie a kontroly cobas® MAI.....	7
Reagencie cobas® omni pro přípravu vzorků	8
Požadavky na uchovávání reagentů	9
Požadavky na manipulaci s reagenty pro systém cobas® 5800 nebo systémy cobas® 6800/8800.....	9
Další materiály potřebné pro systémy cobas® 5800/6800/8800.....	10
Požadované přístroje a software.....	11
Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci.....	12
Varování a bezpečnostní opatření	12
Manipulace s reagenty.....	13
Správná laboratorní praxe.....	13
Odběr, přeprava a uchovávání vzorků.....	14
Vzorky.....	14
Přeprava a uchovávání vzorků.....	14
Uchovávání inaktivovaných vzorků	14
Pokyny k použití	15
Procesní poznámky.....	15
Zpracování vzorku čerstvého sputa	17
Zpracování sedimentů sputa a BAL.....	18
Sonikace vzorků.....	19
Provedení testu cobas® MAI v systémech cobas® 5800/6800/8800.....	20

Výsledky	23
Kontrola kvality a platnost výsledků v softwaru verze 1.4 systémů cobas ® 6800/8800	23
Vyhodnocení výsledků v systémech cobas ® 5800/6800/8800	24
Vyhodnocení výsledků v systému cobas ® 5800 a systémech cobas ® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší	24
Vyhodnocení výsledků v systémech cobas ® 6800/8800 se softwarem verze 1.4	25
Procesní omezení	26
Vyhodnocení výkonnosti	28
Ekvivalence systému	28
Klíčové funkční charakteristiky	28
Inaktivace vzorků	28
Mez detekce (<i>Limit of Detection</i> , LoD)	28
Inkluzivita	28
Preciznost	29
Analytická specifita/zkřížená reaktivita	30
Interference	33
Selhání celého systému	34
Křížová kontaminace	34
Výkonnost s klinickými vzorky	34
Doplňující informace	37
Hlavní parametry testu	37
Symbyly	38
Technická podpora	39
Výrobce	39
Ochranné známky a patenty	39
Autorská práva	39
Literatura	40
Revize dokumentu	41

Účel použití

Test cobas® MAI pro použití se systémy cobas® 5800/6800/8800 je automatizovaný, kvalitativní diagnostický test *in vitro*, který využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) v reálném čase pro přímou detekci a rozlišení DNA *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare* ve vzorcích z lidských dýchacích cest, včetně vzorků čerstvého sputa a digestovaných a dekontaminovaných (ošetřených N-acetyl-L-cysteinem/NaOH [NALC-NaOH]) vzorků sputa a bronchoalveolární laváže (BAL). Tento test se používá ve spojení s kultivací mykobakterií jako pomůcka při diagnostice plicních infekcí *M. avium* a *M. intracellulare*.

Souhrn a výklad testu

Základní informace

M. avium a *M. intracellulare* jsou dva blízce příbuzné ale odlišné druhy pomalu rostoucích netuberkulózních mykobakterií (NTM), které patří do komplexu *M. avium* (MAC) a rodu mykobakterie. NTM jsou druhy mykobakterií odlišné od *M. tuberculosis* a *M. leprae*. NTM jsou obecně volně žijící organismy, které jsou všeobecně rozšířené v prostředí.¹⁻⁴ Byly nalezeny v povrchové vodě, vodě z vodovodu, půdě, domácích i volně žijících zvířatech, mléce a potravinách. Ačkoli NTM mohou kolonizovat tělesné povrchy a sekrety, aniž by způsobovaly onemocnění, jsou spojovány se čtyřmi odlišnými klinickými syndromy: plicními infekcemi (MAC, *M. kansasii* a *M. abscessus*), lymfonodálními infekcemi běžně se vyskytujícími u dětské populace, (MAC, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*), rozptýleným onemocněním u pacientů s vysoce oslabenou imunitou (*M. avium*) a infekcí kůže a měkkých tkání nebo kostí a kloubů, obvykle v důsledku přímé inokulace.⁵

Komplex MAC v současnosti zahrnuje dvanáct druhů pomalu rostoucích mykobakterií z prostředí a zvířat: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. bouchodurhonense*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. indicus pranii*, *M. mantonii*, *M. vulneris*, *M. yongonense*.^{6,7} Existuje 28 sérovarů *M. avium* a *M. intracellulare*.

Hyperlink reference not valid., přičemž *M. avium* zahrnuje 4 poddruhy: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *hominissuis* a *M. avium* subsp. *silvaticum*.⁶ *M. avium* a *M. intracellulare* (MAI) jsou dva zástupci komplexu MAC, kteří jsou nejčastěji spojováni s onemocněním lidí.⁵

MAI jsou především plicní patogeny, které často postihují osoby s oslabenou imunitou (např. pacienty s AIDS, vlasato-buněčnou leukémií nebo podstupující imunosupresivní chemoterapii). MAI se přenášejí vdechnutím do dýchacích cest a požitím do trávicího traktu. Neexistují žádné důkazy o přenosu ze zvířat na člověka nebo z člověka na člověka, proto se považují za nenakažlivé. Plicní infekce MAI jsou spojeny s chronickými plicními chorobami, jako je CHOPN, chronická bronchitida, bronchiektázie, cystická fibróza a rakovina plic. MAI mohou také způsobovat osteomyelitidu, tenosynovitidu, synovitidu; rozptýlená infekce MAI může postihnout lymfatické uzliny, CNS, játra, slezinu a kostní dřeň. Ke kožním infekcím dochází obvykle prostřednictvím přímé inokulace. MAI je nejčastější příčinou infekce NTM u pacientů s AIDS. *M. avium* připadá na více než 95 % pacientů s AIDS, u nichž se rozvine infekce MAI. *M. intracellulare* zodpovídá za 40 % infekcí u imunokompetentních pacientů. Onemocnění plic způsobené MAI se obvykle projevuje dvěma typy klinického a radiologického obrazu jako apikální fibrokavitární onemocnění plic, multifokální bronchiektázie nebo syndrom lady Windermere, který je spojován s nodulárními nebo fibronodulárními plicními infiltráty a kašlem u jinak zdravých štíhlých starších žen.

Výskyt onemocnění způsobených NTM je obtížné zjistit, protože NTM jsou považovány za neinfekční, a proto je v mnoha zemích nelze hlásit zdravotnickým organizacím. Odhady incidence vycházejí z počtu hlášených izolátů NTM a ve většině vyspělých zemí se jeví jako podobné, přičemž se pohybují v rozmezí od 1,0 do 1,8 případu na 100 000 osob.^{5,9} Studie provedená v Oregonu v roce 2009 odhadla roční výskyt 5,6 případu plicní infekce MAC na 100 000 obyvatel, přičemž většina případů (60 %) postihovala ženy.¹⁰ Nejvyšší počet rozptýlených případů MAI hlášených v USA činil 37 000 v roce 1994 na vrcholu epidemie AIDS, a od zavedení vysoce aktivní antiretrovirové terapie incidence klesá. Monitorovací studie uskutečněná ve Francii v letech 2001–2003 odhadla incidenci plicních infekcí způsobených NTM u pacientů bez infekce HIV na 0,72–0,74 na 100 000 obyvatel.¹¹ Podobná studie z Nového Zélandu z roku 2004 odhadla incidenci onemocnění NTM na 1,92 na 100 000 obyvatel.¹²

Diagnóza plicní infekce MAI by měla být zvažována u symptomatických pacientů s nodulárními nebo kavitárními opacitami na rentgenovém snímku hrudníku nebo na snímku CT s vysokým rozlišením, který ukazuje multifokální bronchiektázie s četnými malými uzlíky, pokud byla vyloučena infekce MTB a jiné možné diagnózy.⁵ K diagnóze se doporučuje AFB nátěr a kultivace mykobakterií. Diagnóza vyžaduje:

- (i) pozitivní kultury mykobakterií alespoň ze dvou samostatných vzorků vykašlaného sputa, nebo
- (ii) výsledky pozitivní kultivace mykobakterií alespoň z jednoho bronchiálního výplachu nebo laváže, nebo
- (iii) transbronchiální nebo jinou biopsii plic s mykobakteriálními histopatologickými znaky a pozitivní kultivaci z biopsie a jeden nebo více výplachů sputa nebo bronchiálních výplachů, které jsou kultivačně pozitivní na MAC pro potvrzení infekce.⁵

NTM, včetně MAC, je nutné identifikovat na úrovni druhu. Léčba zahrnuje 2 nebo 3 bakteriostatika první linie po dobu 12 měsíců. Režim první linie zahrnuje makrolidy (klaritromycin nebo azitromycin), ethambutol a rifamyciny (rifampin); antimikrobiální režim druhé linie zahrnuje aminoglykosidy (streptomycin nebo amikacin). Rutinní testování citlivosti izolátů MAC se doporučuje pouze pro klaritromycin vzhledem ke špatné korelaci mezi výsledky *in vitro* a klinickými výsledky u ostatních léčiv.⁵

Předběžnou diagnózu infekce MAC lze stanovit na základě klinického obrazu i rentgenových nálezů a potvrdit záchytem organismu v mykobakteriální kultuře, jak je popsáno výše,⁵ avšak kultivace je pomalá a může trvat několik dnů až týdnů. Alternativně mohou testy metodou amplifikace nukleových kyselin detekovat a rozlišit *M. avium* a *M. intracellulare* přímo z klinických vzorků v řádu hodin pro rychlejší stanovení diagnózy a zahájení empirické léčby. Je však vyžadováno fenotypové testování citlivosti na léky (DST) k potvrzení vhodné empirické léčby, které může po izolaci a identifikaci patogenů v závislosti na metodě trvat další dny až týdny.

Princip testu

Test cobas® MAI pro použití se systémy cobas® 5800/6800/8800 je automatický kvalitativní test PCR v reálném čase pro detekci a rozlišení DNA *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium intracellulare* ve vzorcích z lidských dýchacích cest, včetně vzorků čerstvého sputa a digestovaných a dekontaminovaných (ošetřených NALC-NaOH) sedimentů sputa a BAL. Do každého vzorku je během jeho zpracování v systémech cobas® 5800/6800/8800 přidána interní kontrola DNA používaná pro monitorování celého procesu přípravy vzorku a PCR amplifikace. Test navíc využívá pozitivní kontrolu s nízkým titrem a negativní kontrolu.

Principy postupu

Test **cobas**® MAI je založen na preanalytickém zkapalnění vzorku a inaktivaci mykobakterií, po nichž následuje sonikace vzorku, plně automatizovaná příprava vzorku (extrakce a purifikace nukleové kyseliny) a PCR amplifikace a detekce. Ke zkapalnění vzorku a inaktivaci mykobakterií dochází současně během inkubace vzorku s použitím roztoku **cobas**® Microbial Inactivation Solution (MIS). Před vložením do systémů **cobas**® 5800/6800/8800 se provádí sonikace zkapalněného a inaktivovaného vzorku. Systém **cobas**® 5800 je navržen jako jeden integrovaný přístroj. Systémy **cobas**® 6800/8800 se skládají z modulu pro dodání vzorků, přenosového modulu, zpracovacího modulu a analytického modulu. Software systému **cobas**® 5800 nebo **cobas**® 6800/8800 provádí automatický management dat, při kterém přiřazuje všem testům výsledky pozitivní, negativní nebo neplatné. Výsledky lze prohlížet přímo na obrazovce systému, exportovat nebo vytisknout jako sestavu.

Extrakce nukleové kyseliny ze vzorků pacientů, externích kontrol a přidáných molekul interní kontroly DNA (DNA-IC) probíhá současně. Souhrnně dochází k uvolnění bakteriální nukleové kyseliny chemickým (roztokem MIS, lyzačním reagentem **cobas**® **omni** Lysis Reagent), enzymatickým (proteinázou) a fyzikálním (sonikací) narušením bakterií. Uvolněné nukleové kyseliny se váží na křemičitanový povrch přidáných magnetických skleněných částic. Nenavázané látky a nečistoty, jako například denaturovaný protein, buněčný odpad a případné inhibitory PCR jsou odstraněny během následujících promývacích kroků a purifikovaná nukleová kyselina je eluována z magnetických skleněných částic elučním pufrem při zvýšené teplotě.

K selektivní amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny ze vzorku dochází za použití cílově specifického forward a reverse primeru pro komplex *M. avium*, který je vybrán z vysoce konzervované oblasti v příslušném cílovém organismu. K detekci MAC se používá jedna sada selektivních primerů a *M. avium* a *M. intracellulare* jsou rozlišeny pomocí dvou různých sond v rámci oblasti amplifikace (gen 16S rRNA). K selektivní amplifikaci interní kontroly DNA (DNA IC) dochází pomocí sekvence specifických forward a reverse primerů vybraných tak, aby nebyly homologické s cílovou oblastí komplexu *M. avium*. Teplotně stabilní enzym DNA polymeráza se používá pro PCR amplifikaci. Cílové sekvence a sekvence DNA-IC jsou amplifikovány současně pomocí univerzálního PCR amplifikačního profilu s předem definovanými teplotními kroky a počtem cyklů. Reagencie master mix obsahuje deoxyuridin trifosfát (dUTP), namísto deoxythimidinu trifosfátu (dTTP), který je zabudováván do nově syntetizované DNA (amplikonu). Jakékoliv kontaminující amplikony z předcházejících běhů PCR jsou zničeny enzymem AmpErase, který je přítomen ve směsi PCR Master Mixu, při zahřátí během prvního kroku teplotního cyklu.¹³ Nově vytvořené amplikony však eliminovány nejsou, protože enzym AmpErase je inaktivován po vystavení teplotám nad 55 °C.

Činidlo Master Mix pro test **cobas**® MAI obsahuje po jedné detekční sondě pro *M. avium* a pro *M. intracellulare* a jednu detekční sondu pro DNA-IC. Cílově specifické sondy jsou označeny různými fluorescenčními barvami, které umožňují současnou detekci cíle *M. avium*, cíle *M. intracellulare* a interní kontroly DNA-IC ve třech různých cílových kanálech.^{14, 15} Fluorescenční signály intaktních sond, které nejsou navázány na cílové sekvence, jsou potlačeny zhášecem. Během kroku PCR amplifikace dochází kvůli hybridizaci sond se specifickým templátem jednořetězcové DNA ke štěpení sondy 5'–3' exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, která způsobuje oddělení fluorescenční barvy a zhášече a vznik fluorescenčního signálu. Každý cyklus PCR vytváří větší množství rozštěpených sond a kumulativní signál fluorescenčního barviva se současně zvyšuje. Detekce a rozlišení produktů PCR v reálném čase se provádí měřením fluorescence uvolněných barviv pro cílové sekvence komplexu *M. avium*, respektive interní kontroly DNA-IC.

Reagencie a materiály

Reagencie a kontroly cobas® MAI

Materiály dodávané pro test cobas® HBV uvádí Tab. 1. Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, uvádí Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4, Tab. 10 a Tab. 12.

Všechny neotevřené reagencie a kontroly mají být uchovávány v souladu s doporučeními v Tab. 1 až Tab. 4.

Tab. 1 cobas® MAI

cobas® MAI

Uchovávat při 2–8 °C

Kazeta pro 384 testů (P/N 09040595190)

Součásti soupravy	Složky reagensů	Množství v soupravě
Roztok proteinázy (PASE)	Tris pufr, < 0,05 % EDTA, chlorid vápenatý, octan vápenatý, 8 % proteináza, glycerol EUH210: Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list. EUH208: Obsahuje subtilisin z <i>Bacillus subtilis</i> . Může vyvolat alergickou reakci.	38 ml
DNA interní kontrola (DNA-IC)	Tris pufr, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % konstrukt DNA nepříbuzný MAI, 0,002 % Poly rA RNA (syntetická), < 0,1 % azid sodný	38 ml
Eluční pufr (EB)	Tris pufr, 0,2 % methyl-4-hydroxybenzoát	38 ml
Reagencie Master Mix 1 (MMX-R1)	Octan hořečnatý, hydroxid draselný, < 0,1 % azid sodný	14,5 ml
Reagencie MAI Master Mix 2 (MAI MMX-R2)	Tricinový pufr, octan draselný, EDTA, glycerol, 18 % dimethylsulfoxid, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,1 % Tween 20, < 0,1 % azid sodný, < 0,1 % Z05 DNA-polymeráza, < 0,1 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální), < 0,01 % forward a reverse primery interní kontroly, < 0,01 % upstream a downstream primery MAI, < 0,01 % fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro MAI a interní kontrolu DNA, < 0,01 % oligonukleotidový aptamer	17,5 ml

Tab. 2 Souprava pozitivní kontroly cobas® MAI Positive Control Kit

cobas® MAI Positive Control Kit

Uchovávat při 2–8 °C

Pro použití se systémem cobas® 5800 a systémy cobas® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší (P/N 09040609190)

Pro použití se systémy cobas® 6800/8800 se softwarem verze 1.4 (P/N 07544863190 nebo P/N 09040609190)

Součásti soupravy	Složky reagensů	Množství v soupravě
Pozitivní kontrola MAI (MAI (+) C)	Tris pufr, < 0,05 % azid sodný, < 0,05 % EDTA, 0,002 % Poly rA, < 0,01 % neinfekční DNA plazmid (mikrobiální) obsahující genomové sekvence <i>M. avium</i> a <i>M. intracellulare</i>	16 ml (16 × 1 ml)

Tab. 3 Souprava negativní pufované kontroly cobas® Buffer Negative Control Kit

cobas® Buffer Negative Control Kit

Uchovávat při 2–8 °C

Pro použití se systémem cobas® 5800 a systémy cobas® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší (P/N 09051953190)

Pro použití se systémy cobas® 6800/8800 se softwarem verze 1.4 (P/N 07002238190 nebo P/N 09051953190)

Součásti soupravy	Složky reagensů	Množství v soupravě
Souprava negativní pufované kontroly cobas® (BUF (-) C)	Tris pufr, < 0,1 % azid sodný, EDTA, 0,002 % poly rA RNA (syntetická)	16 ml (16 × 1 ml)

Reagencie cobas® omni pro přípravu vzorků

Tab. 4 Reagencie pro přípravu vzorků **cobas® omni**

Reagencie	Složky reagentů	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997546190)	Magnetické skleněné částice, Tris pufr, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1 % azid sodný	480 testů	Nevztahuje se
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997511190)	Tris pufr, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1 % azid sodný	4 × 875 ml	Nevztahuje se
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997538190)	43 % (hm.) guanidinthiokyanát**, 5 % (hm./obj.) polidokanol**, 2 % (hm./obj.) dithiothreitol**, dihydrát citrátu sodného	4 × 875 ml	 NEBEZPEČÍ H302: Zdraví škodlivý při požití. H314: Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. EUH032: Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami. EUH071: Způsobuje poleptání dýchacích cest. P273: Zabráňte uvolnění do životního prostředí. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/chrániče sluchu. P303 + P361 + P353: PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou. P304 + P340 + P310: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P305 + P351 + P338 + P310: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P391: Uniklý produkt seberte. 593-84-0 Guanidin thiokyanát 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Uchovávat při 15–30 °C (P/N 06997503190)	Dihydrát citrátu sodného, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát	4,2 l	Nevztahuje se

* Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

** Nebezpečná látka nebo směs.

Požadavky na uchovávání reagensí

Reagencie uchovávejte a manipulujte s nimi podle pokynů v Tab. 5, Tab. 6 a Tab. 7.

Pokud nejsou reagencie vloženy v systémech **cobas® 5800** a **cobas® 6800/8800**, uchovávejte je při odpovídající teplotě, kterou uvádí Tab. 5.

Tab. 5 Uskladnění reagensí (když nejsou vložena v systému)

Reagencie	Teplota uchovávání
cobas® MAI	2–8 °C
cobas® MAI 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

Požadavky na manipulaci s reagensiemi pro systém **cobas® 5800** nebo systémy **cobas® 6800/8800**

Reagencie vložené do systému **cobas® 5800** nebo systémů **cobas® 6800/8800** jsou uchovávány při příslušných teplotách a systém monitoruje jejich dobu použitelnosti. Systém umožní používání reagensí, pouze pokud jsou splněny podmínky, které uvádí Tab. 6, Tab. 7 a Tab. 8. Systém automaticky znemožňuje použití expirovaných reagensí. Informace o zbývající stabilitě otevřené soupravy a počtu použitých souprav pro reagencie specifické pro test jsou dostupné prostřednictvím uživatelského rozhraní systému.

Tab. 6 Sledované a uplatňované podmínky doby expirace reagensí v systému **cobas® 5800**

Reagencie	Stabilita otevřené soupravy	Počet použití soupravy	Stabilita v systému
cobas® MAI	90 dnů od prvního použití	40	36 dnů od vložení
cobas® MAI Positive Control Kit	Použití jedné vialky	16	36 dnů od vložení
cobas® Buffer Negative Control Kit	Použití jedné vialky	16	36 dnů od vložení

Tab. 7 Sledované a uplatňované podmínky dodržování doby použitelnosti reagensí v systémech **cobas® 6800/8800**

Reagencie	Stabilita otevřené soupravy	Počet použití soupravy	Stabilita v systému (mimo chladničku)
cobas® MAI	90 dnů od prvního použití	40	40 hodin
cobas® MAI Positive Control Kit	Jedna vialka	16	10 hodin
cobas® Buffer Negative Control Kit	Jedna vialka	16	10 hodin

Tab. 8 ukazuje stabilitu otevřené soupravy reagensí **cobas® omni**. Před každým během systém ověří stabilitu otevřené soupravy a zajistí dostatečný objem náplně. Proto těmto reagensím není přiřazen žádný počet použití soupravy ani stabilita v systému.

Tab. 8 Podmínky dodržování doby použitelnosti reagensů **cobas® omni** v systémech **cobas® 5800/6800/8800**

Reagencie	Stabilita otevřené soupravy
cobas® omni Lysis Reagent	30 dnů od vložení
cobas® omni MGP Reagent	30 dnů od prvního použití
cobas® omni Specimen Diluent	30 dnů od vložení
cobas® omni Wash Reagent	30 dnů od vložení

Další materiály potřebné pro systémy **cobas® 5800/6800/8800**

Tab. 9 Materiály pro použití se systémy **cobas® 5800/6800/8800**

Materiál	P/N
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190

Tab. 10 Spotřební materiál pro použití v systému **cobas® 5800***

Materiál
cobas® omni Processing Plate 24
cobas® omni Amplification Plate 24
cobas® omni Liquid Waste Plate 24
cobas® omni Liquid Waste Container
Špička CORE TIPS s filtrem, 1 ml
Špičky CORE TIPS s filtrem, 300 µl
Pytel na pevný odpad* nebo pytel na pevný odpad s vložkou
S-nosič zkumavek se 16 pozicemi, kompletní
Nosič stojánků s 5 pozicemi

* Čísla součástí jsou uvedena v Asistentu uživatele systému **cobas® 5800**.

Tab. 11 Spotřební materiál pro použití v systémech **cobas® 6800/8800***

Materiál
cobas® omni Processing Plate
cobas® omni Amplification Plate
cobas® omni Pipette Tips
cobas® omni Liquid Waste Container
Pytel na pevný odpad a nádoba na pevný odpad nebo pytel na pevný odpad s vložkou a zásuvka soupravy
STD-Rack. re-run R001-R025 PINK

* Čísla součástí jsou uvedena v Asistentu uživatele systémů **cobas® 6800/8800**.

Tab. 12 Další materiály potřebné pro preanalytický pracovní postup

Materiály
cobas® Microbial Inactivation Solution (P/N 08185476001)
Zkumavkový sonikátor TS 5 (Rinco Ultrasonics AG – P/N 46690)
5ml polypropylenové zkumavky velikosti 75 × 13 mm, s kulatým dnem, se šroubovacím víčkem (Sarstedt – zkumavka P/N 60.504.010, šroubovací víčko P/N 65.163)*
MPA RACK 13 MM LIGHT GREEN 7001-7050 (Roche – P/N 03118878001 nebo ekvivalentní)**
Centrifuga (s možností omezení RCF na max. 3000 × g, kompatibilní se zkumavkami velikosti 75 × 13 mm se šroubovacím víčkem)
Vortexové míchadlo
Termostabilní štítky s čárovými kódy (OPAL Associates AG, P/N 20300824 TR PE-Folie Pharma nebo ekvivalentní)***

* Použití jiných zkumavek než těch, které jsou doporučeny výše, musí být před zahrnutím do pracovního postupu testu **cobas®** MAI v laboratoři ověřeno uživatelem.

** Stojánky MPA velikosti 13 mm jsou nutné k použití sonikátoru zkumavek TS 5. Kontaktujte místního zástupce společnosti Roche ohledně podrobných seznamů pro objednávky stojánek na vzorky v jiných barvách nebo v jiném rozmezí sériových čísel. Upozorňujeme, že stojánky RD5 nejsou se sonikátorem zkumavek TS 5 kompatibilní.

*** Další podrobnosti o specifikacích čárových kódů naleznete v Asistentu uživatele systémů **cobas®** 5800/6800/8800. Použití jiných štítků s čárovými kódy než těch, které jsou doporučeny výše, musí být před zahrnutím do pracovního postupu testu **cobas®** MAI v laboratoři ověřeno uživatelem. Další podrobnosti o kompatibilních štítcích s čárovými kódy a doporučení k ověření kompatibility získáte od místního zástupce společnosti Roche. Použití nekompatibilních štítků s čárovými kódy může vést k poškození zkumavky během sonikace a následné kontaminaci přístroje.

Požadované přístroje a software

V přístrojích musí být nainstalován software **cobas®** 5800, software **cobas®** 6800/8800 a analytický balíček (ASAP) **cobas®** MAI pro systémy **cobas®** 5800/6800/8800.

Spolu se systémem **cobas®** 5800 a systémy **cobas®** 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší je dodáván software x800 Data Manager a PC (nebo server).

Se systémy **cobas®** 6800/8800 se softwarem verze 1.4 je dodáván server Instrument Gateway (IG).

Tab. 13 Přístroje

Vybavení	P/N
Systém cobas® 5800	08707464001
Systém cobas® 6800	05524245001 a 09575154001
Systém cobas® 8800	05412722001 a 09575154001
Modul pro dodání vzorků pro systémy cobas® 6800/8800	06301037001 a 09936882001

Další informace naleznete v Asistentu uživatele systému **cobas®** 5800 nebo systémů **cobas®** 6800/8800.

Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

Varování a bezpečnostní opatření

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správnou výkonnost tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké citlivosti testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi reagensii a amplifikačními směsmi nedošlo ke kontaminaci.

- Pouze pro účely diagnostiky *in vitro*.
- Všechny patientské vzorky musí být považovány za potenciálně infekční. Se všemi biologickými vzorky je proto nutno zacházet, jako by byly infekční, za použití správných laboratorních postupů a odpovídajícího posouzení rizik podle pokynů v publikaci Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích), v dokumentu CLSI číslo M29-A4 a v příručce Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual (Příručka pro biologickou bezpečnost v laboratořích zkoumajících tuberkulózu) organizace WHO.¹⁶⁻¹⁸ Tento postup smí provádět pouze personál zkušený v zacházení s infekčními materiály a použitím testu **cobas® MAI** a systémů **cobas® 5800/6800/8800**.
- Všichni pracovníci musí používat ochranné osobní pomůcky včetně laboratorních plášťů, jednorázových rukavic a ochrany očí a dýchacích cest v souladu s bezpečnostními postupy a praxí dané instituce a dodržovat bezpečnostní postupy dané instituce pro práci s chemickými látkami a biologickými vzorky.
- Každá laboratoř musí stanovit nezbytné kroky pro zacházení se vzorky před inaktivací a po ní pomocí roztoku MIS na základě odpovídajícího posouzení rizik a musí dodržovat doporučené předpisy o biologické bezpečnosti, místní předpisy, pokyny institucí a nařízení.¹⁶
- Úspěšnost mykobakteriální inaktivace závisí na dodržování postupů uvedených v tomto dokumentu a na úplném promíchání vzorku s roztokem MIS. Zkapalnění vzorku a inaktivace mykobakterií pomocí roztoku MIS musí být prováděny v souladu s místními předpisy, pokyny institucí a nařízeními a na základě odpovídajícího posouzení rizik.
- Veškeré materiály pocházející z lidských zdrojů by měly být považovány za potenciálně infekční a musí se s nimi zacházet dle všeobecných bezpečnostních opatření. Pokud dojde k rozliti vzorku, ihned místo dezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného nebo draselného v destilované nebo deionizované vodě nebo postupujte dle vlastních vhodných procesů laboratoře.
- **Pokud dojde k rozliti vzorků upravených roztokem MIS (který obsahuje guanidin thiokyanát), látka se nesmí dostat do styku s chlornanem sodným nebo draselný. Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.** Dojde-li k rozliti vzorků upravených roztokem MIS, NEJDŘÍVE vyčistěte místo roztokem vhodného laboratorního detergentu s vodou a potom 70% etanolem.
- Roztok MIS je citlivý na světlo a dodává se v lahvích zajišťujících ochranu před světlem. Roztok MIS uchovávejte ve svislé poloze.
- Pro zajištění stanovené výkonnosti testu používejte pouze spotřební materiál, který je součástí dodávky, nebo specifikovaný požadovaný materiál.
- Pečlivě dodržujte uvedené postupy a předpisy, aby se zajistilo správné provedení testů. Jakákoliv odchylka od postupů a předpisů může negativně ovlivnit stanovenou výkonnost testu.
- Pokud nebude během manipulace a zpracování vzorků patřičně kontrolována kontaminace přenosem, mohou vzniknout falešně pozitivní výsledky.
- Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Váš místní zástupce společnosti Roche.

- Pokud během použití tohoto testu dojde k jakýmkoli závažným incidentům, informujte o tom místní příslušný úřad a výrobce.

Manipulace s reagensii

- Aby nedošlo u vzorků, reagensií nebo kontrol ke kontaminaci přenosem, zacházejte se všemi reagensii, kontrolami a vzorky podle zásad správné laboratorní praxe.
- Před použitím vizuálně zkontrolujte každou reagenční kazetu, ředidlo, lyzační reagenzie a promývací reagenzie, zda nejeví žádné známky prosakování. Pokud známky prosakování vykazuje, nepoužívejte tento materiál k testování.
- Lyzační reagenzie **cobas® omni** Lysis Reagent a roztok MIS obsahují potenciálně nebezpečnou látku guanidin thiokyanát. Vyhněte se kontaktu reagensií s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám.
- Lyzační reagenzie **cobas® omni** Lysis Reagent a roztok MIS, které obsahují guanidin thiokyanát, se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného nebo draselného. Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.
- Použité kontrolní soupravy obsahují propíchnuté vialky se zbytky reagensií; je třeba dbát zvláštní opatrnosti a vyhnout se rozliti a kontaktu.
- Souprava **cobas®** MAI, souprava pozitivní kontroly **cobas®** MAI Positive Control Kit, souprava negativní kontroly **cobas®** Buffer Negative Control Kit, reagenzie **cobas® omni** MGP Reagent a ředidlo **cobas® omni** Specimen Diluent obsahují konzervant azid sodný. Vyhněte se kontaktu reagensií s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám. Pokud se reagenzie rozlije, zřeďte ji před vytřením dosucha vodou.
- Všechny materiály, který se dostal do kontaktu se vzorky a reagensii, zlikvidujte dle celostátních, respektive místních předpisů.

Správná laboratorní praxe

- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- Se všemi biologickými vzorky včetně vzorků upravených roztokem MIS zacházejte jako s infekčními v souladu s místními předpisy, pokyny institucí a nařízeními a na základě odpovídajícího posouzení rizik.¹⁴
- Při manipulaci se vzorky a reagensii používejte laboratorní rukavice, laboratorní pláště a ochranu očí a dýchacích cest v souladu s pokyny dané institucí. Zabraňte kontaminaci rukavic při manipulaci se vzorky a kontrolami. Mezi manipulací se vzorky a manipulací se soupravou **cobas®** MAI, soupravou pozitivní kontroly **cobas®** MAI Positive Control Kit, soupravou negativní kontroly **cobas®** Buffer Negative Control Kit, reagensii **cobas® omni** a spotřebními materiály je nutná výměna rukavic, aby nedošlo ke kontaminaci.
- Po manipulaci se vzorky a reagensii a po svléknutí rukavic si důkladně dezinfikujte a umyjte ruce.
- Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného nebo draselného v destilované nebo deionizované vodě. Dále povrch otřete 70 % etanolem.
- Pokud dojde k rozliti kapaliny na systémy **cobas®** 5800/6800/8800, řádně povrch zařízení vyčistěte a dekontaminujte podle pokynů v Asistentu uživatele systému **cobas®** 5800 nebo systémů **cobas®** 6800/8800.

Odběr, přeprava a uchovávání vzorků

Pozn.: zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

Vzorky

S testem cobas® MAI lze používat čerstvé sputum i sedimenty sputa a BAL po úpravě NALC-NaOH.

Přeprava a uchovávání vzorků

Vzorky čerstvého sputa lze uchovávat a/nebo přepravovat po dobu až 3 dnů při teplotě 2 až 35 °C a následně až 7 dnů při teplotě 2 až 8 °C před zkapalněním vzorku a inaktivací roztokem MIS. Pro dlouhodobé uchovávání vzorků čerstvého sputa neupravených roztokem MIS se doporučuje teplota ≤ -20 °C.

Vzorky sedimentů sputa a BAL po ošetření NALC-NaOH lze uchovávat až po dobu 7 dnů při teplotě 2 až 8 °C před inaktivací vzorku roztokem MIS. V případě dlouhodobého uchovávání sedimentů sputa a BAL neupravených roztokem MIS lze vzorky uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotách ≤ -20 °C po dobu až 9 měsíců včetně dvou cyklů zmrazení/rozmrazení.

Pokud mají být vzorky přepravovány, musí být zabaleny a označeny v souladu s platnými státními a/nebo mezinárodními předpisy o přepravě infekčních vzorků a etiologických agens.

Uchovávání inaktivovaných vzorků

Vzorky čerstvého sputa a sedimentů sputa a BAL po ošetření NALC-NaOH, které byly upraveny pomocí roztoku MIS (inaktivovány), lze uchovávat až 12 hodin při teplotě 15 až 35 °C a následně až 7 dnů při teplotě 2 až 8 °C a 30 dnů při teplotě ≤ -20 °C včetně dvou cyklů zmrazení/rozmrazení před zpracováním v systémech cobas® 5800/6800/8800.

Pozn.: vzorky upravené roztokem MIS nemusí zmrznout kvůli vysokému obsahu isopropanolu.

Pozn.: sonikaci vzorků lze provést kdykoli po počáteční inkubaci s použitím roztoku MIS minimálně po dobu 60 minut. Další podrobnosti naleznete v části „Sonikace vzorků“.

Pokyny k použití

Procesní poznámky

- Nepoužívejte reagentie testu **cobas**® MAI, soupravy pozitivní kontroly **cobas**® MAI Positive Control Kit, soupravy negativní kontroly **cobas**® Buffer Negative Control Kit, MIS ani reagentie **cobas**® omni po uplynutí jejich doby použitelnosti.
- Nepoužívejte spotřební materiál opakovaně. Slouží pouze k jednorázovému použití.
- Test **cobas**® MAI lze provádět s minimálním objemem vzorku 1,2 ml, z čehož je zpracováno 850 µl.
- Ujistěte se, že termostabilní štítky s čárovými kódy vzorků na vzorkových zkumavkách jsou otočeny tak, aby byly viditelné přes otvory v horní části po stranách stojánků na vzorky MPA. Příslušné specifikace čárových kódů a doplňující informace o vkládání vzorkových zkumavek najdete v Obr. 1 a v Asistentu uživatele systémů **cobas**® 5800/6800/8800.
- Ujistěte se, že vzorkové zkumavky jsou po sonikaci a před vložením do systémů **cobas**® 5800/6800/8800 otevřeny.
- Pokyny k řádné údržbě přístrojů najdete v Asistentu uživatele systémů **cobas**® 5800/6800/8800.

Před provedením testu MAI v systémech **cobas**® 5800/6800/8800 musí být vzorky zpracovány podle pokynů v následujících částech: „Zpracování vzorku čerstvého sputa“ nebo „Zpracování sedimentů sputa a BAL“ a „Sonikace vzorků“. Zkrácené reprezentativní pracovní postupy shrnuje Tab. 14 pro vzorky čerstvého sputa a Tab. 15 pro vzorky sedimentu. Další podrobnosti naleznete v následujících částech.

Pozn.: zacházení se vzorky před a po inaktivaci pomocí roztoku **cobas**® MIS musí být prováděno v souladu s místními předpisy, pokyny institucí a nařízeními a na základě odpovídajícího posouzení rizik.¹⁶

Pozn.: sonikace vzorků upravených roztokem MIS musí být prováděna v souladu s místními předpisy, pokyny institucí a nařízeními a na základě odpovídajícího posouzení rizik.¹⁶

Tab. 14 Přehled pracovního postupu – vzorek typu čerstvé sputum

1				Přidejte 2 díly roztoku MIS na 1 díl čerstvého sputa.
2		30–60 sekund		Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.
3		≥ 60 minut		Inkubujte vzorek po dobu alespoň 60 min při teplotě 15–30 °C (pokojové teplotě).
4		30–60 sekund		Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.
5		1,2 ml pro 1 test 2,4 ml pro 2 testy 3,6 ml pro 3 testy		Přeneste 1,2 až 3,6 ml vzorku upraveného roztokem MIS do sekundární zkumavky se šroubovacím víčkem.
6		5 minut		Vzorek upravený roztokem MIS sonikujte.
7		Max. 1 minutu		Centrifugujte vzorek nejdéle 1 minutu při maximální RCF 3000 × g.
8				Vložte otevřený vzorek do systému cobas ® 5800 nebo systémů cobas ® 6800/8800 a spusťte běh s použitím vzorku typu čerstvé sputum.

Tab. 15 Přehled pracovního postupu – vzorek typu sediment

1		0,2 ml pro 1 test 0,4 ml pro 2 testy 0,6 ml pro 3 testy	Vortexujte a přeneste 0,2 až 0,6 ml vzorku sedimentu do sekundární zkumavky se šroubovacím víčkem.
2	  		Přidejte 5 dílů roztoku MIS na 1 díl vzorku sedimentu. • 1 ml MIS pro 1 test (0,2 ml vzorku sedimentu) • 2 ml MIS pro 2 testy (0,4 ml vzorku sedimentu) • 3 ml MIS pro 3 testy (0,6 ml vzorku sedimentu)
3		30–60 sekund	Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.
4		≥ 60 minut	Inkubujte vzorek po dobu alespoň 60 minut při teplotě 15–30 °C (pokojové teplotě).
5		30–60 sekund	Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.
6		5 minut	Vzorek upravený roztokem MIS sonikujte.
7		Max. 1 minutu	Centrifugujte vzorek nejdéle 1 minutu při maximální RCF 3000 × g.
8			Vložte otevřený vzorek do systému cobas® 5800 nebo systémů cobas® 6800/8800 a spusťte běh s použitím vzorku typu sediment.

Zpracování vzorku čerstvého sputa

- Zkontrolujte, zda je nádobka s čerstvým sputem řádně označena a zda obsahuje minimálně 0,4 ml sputa. Pokud je vzorek uložen ve zmrazeném stavu, rozmrazte jej a nechte zahřát na teplotu okolí.
- Před použitím lahvičky s roztokem MIS dvakrát až čtyřikrát obraťte.
- Otevřete nádobku se sputem a přidejte přibližně dva díly roztoku MIS na jeden díl vzorku sputa (např. 2 ml roztoku MIS na 1 ml vzorku sputa) vizuálním odhadem objemu a pomocí jednorázové pipety. Nádobku se sputem pevně uzavřete.
- Lahvičky s roztokem MIS po použití ihned uzavřete.
- Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.

Pozn.: zajistěte, aby byl celý vzorek sputa promíchán s roztokem MIS.

- Inkubujte vzorek po dobu alespoň 60 min při teplotě 15–30 °C (pokojové teplotě).

Pozn.: limitní podmínky pro uchovávání vzorků jsou popsány v části „Uchovávání inaktivovaných vzorků“.

- Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund, případně dokud nebude vzorek zcela homogenizován.

- Přeneste minimálně 1,2 ml, avšak ne více než 3,6 ml vzorku upraveného roztokem MIS do polypropylenové zkumavky o objemu 5 ml a velikosti 75 × 13 mm, s kulatým dnem, opatřené šroubovacím víčkem (Sarstedt – zkumavka P/N 60.504.010, víčko P/N 65.163), která je označena termostabilním štítkem s čárovým kódem. Zkumavku pevně uzavřete.

Pozn.: před přenosem vzorku zkontrolujte, zda se informace čárového kódu na nádobce se sputem a na sekundární zkumavce o objemu 5 ml shodují.

Pozn.: viz Tab. 16.

- Před provedením testu cobas® MAI sonikujte inaktivovaný vzorek podle pokynů v části „Sonikace vzorků“.

Zpracování sedimentů sputa a BAL

- Zkontrolujte, zda je nádobka se sedimentem sputa a BAL po ošetření NALC-NaOH řádně označena a zda obsahuje minimálně 0,2 ml vzorku. Pokud je vzorek uložen ve zmrazeném stavu, rozmrazte jej a nechte zahřát na teplotu okolí.
- Vortexujte vzorek sedimentu minimálně po dobu 10 sekund.
- Přeneste minimálně 0,2 ml, avšak ne více než 0,6 ml vzorku sedimentu do polypropylenové zkumavky o objemu 5 ml a velikosti 75 × 13 mm, s kulatým dnem, opatřené šroubovacím víčkem (Sarstedt – zkumavka P/N 60.504.010, víčko P/N 65.163), která je označena štítkem s čárovým kódem.

Pozn.: před přenosem vzorku zkontrolujte, zda se informace čárového kódu na nádobce se vzorkem a na sekundární zkumavce o objemu 5 ml shodují.

- Před použitím lahvičky s roztokem MIS dvakrát až čtyřikrát obraťte.
- Přidejte pět dílů roztoku MIS na jeden díl vzorku (např. 1 ml roztoku MIS na 0,2 ml vzorku). Zkumavku pevně uzavřete.

Pozn.: viz Tab. 16.

- Lahvičky s roztokem MIS po použití ihned uzavřete.
- Silně protřepejte 10–20krát nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.

Pozn.: zajistěte, aby byl celý vzorek promíchán s roztokem MIS.

- Inkubujte vzorek po dobu alespoň 60 min při teplotě 15–30 °C (pokojové teplotě).

Pozn.: limitní podmínky pro uchovávání vzorků jsou popsány v části „Uchovávání inaktivovaných vzorků“.

- Silně protřepejte nebo vortexujte po dobu 30–60 sekund.
- Před provedením testu cobas® MAI sonikujte inaktivovaný vzorek podle pokynů v části „Sonikace vzorků“.

Tab. 16 Požadavky na objem vzorků upravených roztokem **cobas®** Microbial Inactivation Solution pro provedení testu **cobas®** MAI

Počet testů prováděných ze sekundární zkumavky	Minimální požadovaný objem vzorku upraveného roztokem MIS	Maximální přípustný objem vzorku upraveného roztokem MIS
1 zadání testu	1,2 ml	3,6 ml
2 objednávky testů*	2,4 ml	3,6 ml
3 objednávky testů*	3,6 ml	3,6 ml

* Možnost zpracování v kombinovaných dávkách s jinými testy **cobas®** 5800/6800/8800 s použitím stejného typu vzorku nebo pro opakované testování.

Sonikace vzorků

- Sonikace vzorků pro provedení testu **cobas®** MAI musí být provedena sonikátorem zkumavek TS 5 od společnosti Rinco Ultrasonics AG (P/N 46690). Použití jiných sonikátorů může vést k falešně pozitivním, falešně negativním a/nebo neplatným výsledkům. Provoz sonikátoru je podrobně popsán v uživatelské příručce dodané výrobcem.
- Umístěte pět zkumavek označených čárovým kódem a uzavřených šroubovacím víčkem, které obsahují 1,2 ml až 3,6 ml vzorku upraveného roztokem MIS do stojánu MPA.

Pozn.: ujistěte se, že termostabilní štítky s čárovými kódy vzorků na vzorkových zkumavkách jsou otočeny tak, aby byly viditelné přes otvory v horní části po stranách stojánu na vzorky MPA (viz Obr. 1).

Pozn.: ujistěte se, že každá zkumavka má jeden štítek s čárovým kódem.

Pozn.: ujistěte se, že je obsazeno všech pět pozic pro zkumavky ve stojánu MPA. Pokud je k dispozici méně než pět zkumavek obsahujících vzorek upravený roztokem MIS, musí být zbývající místa obsazena „slepými“ zkumavkami stejného typu a se štítkem s čárovým kódem naplněnými vodou nebo roztokem MIS.

Obr. 1 Správné umístění vzorkových zkumavek ve stojánu MPA před sonikací

- Spusťte sonikátor zkumavek.
- Zvolte předdefinovaný sonikační profil „Respiratory Samples“ (Vzorky z dýchacích cest).
- Otevřete prostředek pro sonikaci zkumavek a vložte stojánek MPA podle pokynů výrobce.
- Zavřete sonikátor zkumavek.
- Spusťte sonikační běh.

- Potvrďte, že sonikační běh proběhl úspěšně, a vyjměte stojánek MPA.
Pozn.: očekává se, že se zkumavky se vzorky během sonikačního cyklu zahřejí. Při vyjímání stojánku MPA se vzorkovými zkumavkami dbejte zvýšené opatrnosti.
Pozn.: v případě neúspěšné sonikace si přečtěte pokyny výrobce, odstraňte příčinu a sonikaci opakujte poté, co necháte vzorky alespoň 15 minut vychladnout.
- Vzorky upravené roztokem MIS lze po sonikaci zpracovat s testem **cobas® MAI** nebo uložit podle pokynů v části „Uchovávání inaktivovaných vzorků“.

Provedení testu **cobas® MAI** v systémech **cobas® 5800/6800/8800**

- Provoz přístrojů je podrobně popsán v Asistentu uživatele systému **cobas® 5800** nebo systému **cobas® 6800/8800**.
- Pokyny k řádné údržbě přístrojů najdete v Asistentu uživatele systému **cobas® 5800** nebo systému **cobas® 6800/8800**.
- Před otevřením zkumavek a vložením vzorků do systému **cobas® 5800** doporučujeme peletovat zbytky buněk a matrice centrifugací vzorku po dobu maximálně 1 minuty při maximální RCF 3000 × g.
- Jeden běh může obsahovat kombinaci vzorků (čerstvé sputum, sediment).
- Ujistěte se, že štítky s čárovými kódy vzorků na vzorkových zkumavkách jsou viditelné přes otvory po stranách stojánků na vzorky RD5 nebo MPA. Příslušné specifikace čárových kódů a doplňující informace o vkládání vzorkových zkumavek najdete v Asistentu uživatele systému **cobas® 5800** nebo systému **cobas® 6800/8800**.

Pozn.: vortexujte vzorky pod dobu minimálně 10 sekund, pokud byly uloženy déle než 1 hodinu po sonikaci a před centrifugací.

Pozn.: vynechání kroku odstředování může mít za následek zvýšenou míru vzniku sraženin ve vzorku v systému **cobas® 5800**.

Obr. 2 Postup testu cobas® MAI v systému cobas® 5800

1	Přihlaste se do systému
2	Vložení vzorků do systému • Otevřete zkumavky • Umístěte zkumavku přímo do stojánku • Vložte stojánky na vzorky do systému • Systém se automaticky připraví • Objednejte testy • Pro objednávku vzorků čerstvého sputa upravených roztokem MIS zvolte možnost „Raw sputum“ (Čerstvé sputum) • Pro objednávku vzorků sedimentu sputa/BAL upravených roztokem MIS zvolte možnost „Sediment“
3	Doplňte reagenty a spotřební materiál podle pokynů systému: • Vložte reagenční kazetu (kazety) specifickou pro test • Vložte ministožany s kontrolami • Vložte špičky pro zpracování vzorků • Vložte eluční špičky • Vložte destičky pro zpracování vzorků • Vložte destičky na kapalný odpad • Vložte destičky pro amplifikaci • Vložte kazetu MGP • Doplňte ředidlo vzorku • Doplňte lyzační reagenty • Doplňte promývací reagenty
4	V uživatelském rozhraní spusťte běh výběrem tlačítka Start zpracování; všechny následné běhy se spustí automaticky, pokud nebudou manuálně odloženy
5	Zkontrolujte a exportujte výsledky
6	Vyjměte a uzavřete víčkem vzorkové zkumavky se vzorkem, které splňují požadavky minimálního objemu, budou-li třeba pro budoucí použití Vyčistěte přístroj: • Vyjměte prázdné ministožany s kontrolami • Vyjměte prázdné reagenční kazety specifické pro test • Vyprázdněte zásuvku pro amplifikační destičky • Vyprázdněte kapalný odpad • Vyprázdněte pevný odpad

Obr. 3 Postup testu cobas® MAI na systémech cobas® 6800/8800

1	Přihlaste se do systému Stiskněte Start pro přípravu systému Objednejte testy - Pro objednávku vzorků čerstvého sputa upravených roztokem MIS zvolte možnost „Raw sputum“ (Čerstvé sputum) - Pro objednávku vzorků sedimentu sputa/BAL upravených roztokem MIS zvolte možnost „Sediment“
2	Doplňte reagenty a spotřební materiál podle pokynů systému: - Vložte reagenční kazetu specifickou pro test - Vložte kontrolní kazety - Vložte pipetovací špičky - Vložte destičky pro zpracování vzorků - Vložte reagent MGP - Vložte destičky pro amplifikaci - Doplňte ředidlo vzorku - Doplňte lyzační reagent - Doplňte promývací reagent
3	Vkládání vzorků do systému - Pro každý vzorek - Otevřete zkumavku - Umístěte zkumavku do stojánku - Vložte vzorkový stojánek a stojánek pro ucpané špičky do modulu pro dodání vzorků - Potvrďte, že vzorky byly přijaty do přenosového modulu
4	Spustíte běh
5	Zkontrolujte a exportujte výsledky
6	Vyjměte a uzavřete víčkem vzorkové zkumavky se vzorkem, které splňují požadavky minimálního objemu, budou-li třeba pro budoucí použití Vyčistěte přístroj: - Vyjměte prázdné kontrolní kazety - Vyprázdněte zásuvku pro amplifikační destičky - Vyprázdněte kapalný odpad - Vyprázdněte pevný odpad

Výsledky

Test **cobas**® MAI automaticky detekuje a rozlišuje DNA *M. avium* a *M. intracellulare* u vzorků a kontrol, zobrazuje platnost testu a jednotlivé cílové výsledky.

- Kontrola kvality a platnost výsledků v systému **cobas**® 5800 a systémech **cobas**® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší.
- Nejméně každých 72 hodin a s každou novou šarží soupravy je zpracována jedna negativní kontrola **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] a jedna pozitivní kontrola **cobas**® MAI Positive Control [MAI (+) C]. Pozitivní nebo negativní kontroly lze plánovat častěji na základě laboratorních postupů nebo místních předpisů.
- V softwaru a/nebo v sestavě zkontrolujte značky a odpovídající výsledky a ujistěte se, že jsou výsledky platné (viz „Seznam kódů značek“ v Asistentu uživatele nástroje x800 Data Manager).
- Pokud jsou příslušné cíle kontroly nahlášeny jako platné, jsou ve sloupci „Control result“ (Výsledek kontroly) označeny „Valid“ (Platné). Pokud jsou příslušné cíle kontrol nahlášeny jako neplatné, jsou ve sloupci „Control result“ označeny „Invalid“ (Neplatné).
- Kontroly označené „Invalid“ zobrazují ve sloupci „Flags“ (Značky) značku. Další informace o tom, proč je kontrola nahlášena jako neplatná, včetně informací o značce, se zobrazí v detailním zobrazení.
- Pokud je jedna z kontrol neplatná, opakujte testování všech kontrol a všech souvisejících vzorků.

Software přístroje automaticky ověří platnost výsledků na základě výsledků kontrol.

POZN.: systém **cobas**® 5800 a systémy **cobas**® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší budou dodány se standardním nastavením zpracování soupravy kontrol (pozitivní a negativní) pro každý běh, lze však konfigurovat méně častý interval až do maxima 72 hodin v závislosti na postupech laboratoře nebo místních předpisech. Další informace vám poskytne servisní technik společnosti Roche a/nebo zákaznická technická podpora společnosti Roche.

Kontrola kvality a platnost výsledků v softwaru verze 1.4 systémů **cobas**® 6800/8800

- S každou dávkou pro požadovaný typ výsledku je zpracována jedna negativní kontrola **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] a jedna pozitivní kontrola **cobas**® MAI Positive Control [MAI (+) C].
- V softwaru systémů **cobas**® 6800/8800 a/nebo v sestavě zkontrolujte značky a odpovídající výsledky a ujistěte se, že je dávka platná.
- Všechny značky jsou popsány v Asistentu uživatele systémů **cobas**® 6800/8800.
- Dávka je platná, pokud se u obou kontrol neobjeví žádné značky. Pokud je dávka neplatná, je nutné opakovat testování celé dávky.

Software přístroje automaticky ověří platnost výsledků dávky na základě výsledků kontrol.

Vyhodnocení výsledků v systémech cobas® 5800/6800/8800

Výsledky a jejich odpovídající interpretace pro detekci MAI obsahuje Tab. 17.

Tab. 17 Výsledky testu cobas® MAI a jejich interpretace

Cíl 1	Cíl 2	Interpretace
MIN Positive	MAV Positive	Všechny požadované výsledky byly platné. Cílový signál byl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> a <i>M. avium</i> .
MIN Positive	MAV Negative	Všechny požadované výsledky byly platné. Cílový signál byl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> . Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. avium</i> .
MIN Positive	Invalid	Ne všechny požadované výsledky byly platné. Cílový signál byl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> . Výsledek <i>M. intracellulare</i> je platný. Výsledek <i>M. avium</i> je neplatný. Pro získání platných výsledků <i>M. avium</i> je nutné původní vzorek testovat znovu. Pokud je výsledek nadále neplatný, je nutné získat nový vzorek.
MIN Negative	MAV Positive	Všechny požadované výsledky byly platné. Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> . Cílový signál byl detekován pro DNA <i>M. avium</i> .
MIN Negative	MAV Negative	Všechny požadované výsledky byly platné. Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> . Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. avium</i> .
MIN Negative	Invalid	Ne všechny požadované výsledky byly platné. Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. intracellulare</i> . Výsledek <i>M. intracellulare</i> je platný. Výsledek <i>M. avium</i> je neplatný. Pro získání platných výsledků <i>M. avium</i> je nutné původní vzorek testovat znovu. Pokud je výsledek nadále neplatný, je nutné získat nový vzorek.
Invalid	MAV Positive	Ne všechny požadované výsledky byly platné. Výsledek <i>M. intracellulare</i> je neplatný. Pro získání platných výsledků <i>M. intracellulare</i> je nutné původní vzorek testovat znovu. Pokud je výsledek nadále neplatný, je nutné získat nový vzorek. Cílový signál byl detekován pro DNA <i>M. avium</i> . Výsledek <i>M. avium</i> je platný.
Invalid	MAV Negative	Ne všechny požadované výsledky byly platné. Výsledek <i>M. intracellulare</i> je neplatný. Pro získání platných výsledků <i>M. intracellulare</i> je nutné původní vzorek testovat znovu. Pokud je výsledek nadále neplatný, je nutné získat nový vzorek. Žádný cílový signál nebyl detekován pro DNA <i>M. avium</i> . Výsledek <i>M. avium</i> je platný.
Invalid	Invalid	Oba výsledky, <i>M. intracellulare</i> i <i>M. avium</i> , jsou neplatné. Pro získání platných výsledků <i>M. intracellulare</i> a <i>M. avium</i> je nutné původní vzorek testovat znovu. Pokud jsou výsledky nadále neplatné, je nutné získat nový vzorek.

Vyhodnocení výsledků v systému cobas® 5800 a systémech cobas® 6800/8800 se softwarem verze 2.0 nebo vyšší

Výsledky vzorků jsou uvedeny v softwaru v aplikaci „Results“ (Výsledky). Příklady zobrazení výsledků jsou znázorněny na Obr. 4.

U platné kontrolní dávky zkontrolujte u všech individuálních vzorků přítomnost značek v softwaru a/nebo v sestavě. Interpretace výsledků je následující:

- Vzorky související s platnou dávkou kontrol jsou ve sloupci „Control result“ (Výsledek kontroly) zobrazeny jako „Valid“ (Platné), pokud jsou příslušné cílové výsledky kontrol hlášeny jako platné. Vzorky související s chybnou dávkou kontrol jsou ve sloupci „Control result“ zobrazeny jako „Invalid“ (Neplatné), pokud jsou příslušné cílové výsledky kontrol hlášeny jako neplatné.

- Jsou-li související kontroly výsledku vzorku neplatné, přidá se do výsledku vzorku konkrétní značka takto:
 - Q05D: chyba ověření výsledku z důvodu neplatné pozitivní kontroly.
 - Q06D: chyba ověření výsledku z důvodu neplatné negativní kontroly.
- Hodnoty ve sloupci „Results“ (Výsledky) pro jednotlivé cílové výsledky vzorku by měly být interpretovány tak, jak je uvedeno Tab. 17 výše.
- Pokud má jeden či více cílových výsledků vzorku označení „Invalid“, software zobrazí značku ve sloupci „Flags“ (Značky). Další informace o tom, proč je výsledek cílového vzorku nahlášen jako neplatný, včetně informací o značce, se zobrazí v detailním zobrazení.

Obr. 4 Příklad výsledků testu cobas® MAI v systému cobas® 5800 a systémech cobas® 6800/8800 se softwarem verze 2.0

ID vzorku	Test	Výsledek kontroly	Značka	Stav	Výsledek		Datum/čas vytvoření
MAI_S_pos-02	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 38.51)	MAV Positive (Ct 39.27)	6/30/2022 1:33:50 PM
MAI_S_pos-01	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 37.15)	MAV Positive (Ct 37.42)	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_S_neg-02	MAI	Valid		Released	MIN Negative	MAV Negative	6/30/2022 1:33:52 PM
MAI_S_neg-01	MAI	Valid		Released	MIN Negative	MAV Negative	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_S_inv-01	MAI	Valid		Released	MIN Invalid	MAV Invalid	6/30/2022 1:33:53 PM
MAI_RS_pos-02	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 38.72)	MAV Positive (Ct 38.61)	6/30/2022 1:33:51 PM
MAI_RS_pos-01	MAI	Valid		Released	MIN Positive (Ct 37.39)	MAV Positive (Ct 37.49)	6/30/2022 1:33:51 PM

Vyhodnocení výsledků v systémech cobas® 6800/8800 se softwarem verze 1.4

U každé platné dávky zkontrolujte u všech individuálních vzorků přítomnost značek v software systémech cobas® 6800/8800 nebo ve sestavě. Interpretace výsledků je následující:

- Platná dávka může zahrnovat jak platné, tak i neplatné výsledky vzorků.
- Sloupce „Valid“ a „Overall Result“ nejsou relevantní (Not Applicable, NA) pro výsledky testu cobas® MAI u vzorků a jsou označeny „NA“. Hodnoty uvedené v těchto sloupcích nejsou relevantní a **nemají** vliv na platnost výsledků uvedených ve sloupcích s individuálními cílovými výsledky.
- Cílové výsledky uvedené u jednotlivých vzorků jsou platné, pokud nejsou označeny „Invalid“ ve sloupci s individuálním cílovým výsledkem.
- Výsledky tohoto testu je nutné interpretovat ve spojení s informacemi získanými na základě klinického hodnocení a anamnézy pacienta.

Obr. 5 Příklad výsledků testu **cobas®** MAI v systémech **cobas®** 6800/8800 se softwarem verze 1.4

Test	ID vzorku	Platný	Značky	Typ vzorku	Celkový výsledek	Cíl 1	Cíl 2
MAI	MAI_R_0001	NA		Raw sputum	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI	MAI_R_0002	NA		Raw sputum	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI	MAI_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	NA	Invalid	Invalid
MAI	MAI_S_0001	NA		Sediment	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI	MAI_S_0002	NA		Sediment	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI	MAI_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid
MAI	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid
MAI	C161420284093009580264	Yes		MAI (+) C	Valid	Valid	Valid

Procesní omezení

- Test **cobas®** MAI by měl být vždy prováděn společně s kultivací mykobakterií, aby se minimalizovalo riziko falešně negativních výsledků a současně bylo možné provést vyšetření citlivosti na léky u izolátu MAC, které je nápomocné při péči o pacienta.
- Výkonnost testu **cobas®** MAI byla validována pro vzorky čerstvého sputa a vzorky sedimentu sputa a BAL, které byly zkapalněny, dekontaminovány a koncentrovány pomocí NALC-NaOH. Použití jiných typů vzorků může vést k falešně pozitivním, falešně negativním a/nebo neplatným výsledkům.
- Digesci a dekontaminaci provádějte s použitím postupů NALC-NaOH doporučených organizací CDC.¹⁹ Jiný způsob přípravy vzorků před analýzou může vést k falešně pozitivním, falešně negativním a/nebo neplatným výsledkům.
- Test **cobas®** MAI je validován pro použití se vzorky čerstvého sputa a sedimentu sputa a BAL po ošetření NALC-NaOH, které byly chemicky inaktivovány pomocí roztoku MIS. Jiné postupy inaktivace nebyly posuzovány a mohou vést k falešně pozitivním, falešně negativním a/nebo neplatným výsledkům.
- Úspěšnost mykobakteriální inaktivace závisí na dodržování postupů uvedených v tomto dokumentu a na úplném promíchání vzorku s roztokem MIS. Zkapalnění vzorku a inaktivace mykobakterií pomocí roztoku MIS musí být prováděny v souladu s místními předpisy, pokyny institucí a nařízeními a na základě odpovídajícího posouzení rizik.
- Překročení objemových omezení a/nebo odchýlení se od procedurálních kroků uvedených v částech „Zpracování vzorků čerstvého sputa“, „Zpracování sedimentů sputa a BAL“ a „Sonikace vzorků“ může vést k falešně pozitivním, falešně negativním nebo neplatným výsledkům.
- Testy metodou amplifikace nukleových kyselin nedokážou stanovit životaschopnost organismů.
- Testem nelze určit, zda bude terapie úspěšná nebo neúspěšná.
- Tento produkt smí používat pouze personál vyškolený v technikách PCR a v používání systému **cobas®** 5800/6800/8800.
- Test **cobas®** MAI byl hodnocen pouze při použití v kombinaci se soupravou pozitivní kontroly **cobas®** MAI Positive Control Kit, soupravou negativní kontroly **cobas®** Buffer Negative Control Kit, reagensií **cobas®** **omni** MGP Reagent, lyzačnou reagensií **cobas®** **omni** Lysis Reagent, ředidlem **cobas®** **omni** Specimen Diluent a promývací reagensií **cobas®** **omni** Wash Reagent se systémy **cobas®** 5800/6800/8800, roztokem MIS a sonikátorem zkumavek TS 5 od společnosti Rinco Ultrasonics AG.
- Spolehlivost výsledků závisí na dodržování řádných postupů při odběru a uchovávání vzorků i při manipulaci s nimi.

- Test **cobas**® MAI není indikován k použití se vzorky z dýchacích cest za účelem monitorování odpovědi na léčbu nebo ověření vyléčení.
- Test **cobas**® MAI rozlišuje druhy *M. intracellulare* a *M. avium*. Další druhy komplexu *M. avium* jsou testem **cobas**® MAI detekovány, avšak nejsou rozlišeny. Jsou detekovány buď v rámci cíle *M. intracellulare*, nebo v rámci cíle *M. avium*. Podrobnosti jsou uvedeny ve studii inkluzivity v části „Vyhodnocení výkonnosti“.
- Detekce komplexu *M. avium* je závislá na počtu organismů nacházejících se ve vzorku. Tento počet může být ovlivněn metodou odběru vzorku a faktory na straně pacienta (např. věkem, závažností onemocnění a HIV pozitivitou/negativitou).
- V případě pacientů infikovaných virem MAC i HIV existuje vyšší pravděpodobnost, že vzorky budou vyhodnoceny jako negativní při mikroskopickém vyšetření nátěru, tj. DNA MAC bude přítomna na úrovních, které jsou pod mezí detekce testu.
- Poskytovatelé zdravotní péče musí výsledky interpretovat v kontextu anamnézy a klinického obrazu pacienta a také výsledků dalších laboratorních a radiografických vyšetření.
- V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní nebo neplatné. V testu **cobas**® MAI je zahrnuta interní kontrola, která napomáhá identifikovat vzorky obsahující substance, které mohou interferovat s izolací nukleové kyseliny a PCR amplifikací.
- Přidání enzymu AmpErase do Master Mixu testu **cobas**® MAI umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy uvedené v tomto návodu k použití.
- I když se to děje vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech genomové DNA komplexu *M. avium* pokryté primery a/nebo sondami testu **cobas**® MAI mohou vést k selhání detekce přítomnosti bakterie.
- Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem k jiné technologii provedli ve své laboratoři korelační metodické studie a posoudili rozdíly mezi technologiemi. V důsledku výše zmíněných rozdílů mezi technologiemi nelze mezi výsledky očekávat stoprocentní shodu.
- Použití jiných zkumavek než těch, které jsou doporučeny v Tab. 10, musí být před zahrnutím do pracovního postupu testu **cobas**® MAI v laboratoři ověřeno uživatelem. Použití jiných typů zkumavek může vést k poškození zkumavek a kontaminaci povrchu sonikátoru. Rovněž hrozí falešně negativní výsledky v důsledku nedostatečného přenosu energie při sonikaci.
- Použití jiných čárových kódů než těch, které jsou doporučeny v Tab. 10, musí být před zahrnutím do pracovního postupu testu **cobas**® MAI v laboratoři ověřeno uživatelem. Při použití jiných čárových kódů hrozí poškození čárového kódu.

Vyhodnocení výkonnosti

Ekvivalence systému

Ekvivalence systémů **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 a **cobas**® 8800 byla prokázána ve studiích výkonnosti. Data uvedená v tomto pokynech k použití dokládají stejnou výkonnost u všech systémů.

Klíčové funkční charakteristiky

Inaktivace vzorků

Snížení rizika mykobakteriální infekce úpravou vzorků pomocí roztoku MIS bylo hodnoceno s použitím vysoce pozitivních kultur dvou kmenů komplexu MTB (MTB CDC268 a MTB H37) na třech různých pracovištích a za použití tří různých šarží reagentie MIS. Pro každou z těchto podmínek bylo pět alikvotů kultury o hladinách koncentrace do 5×10^7 CFU/ml upraveno roztokem MIS v poměru 1 : 2 po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Vzorky byly poté odstředovány po dobu 15 minut při $3000 \times g$, dvakrát promyty sterilním roztokem PBS a nakonec resuspendovány v 0,5 ml sterilního roztoku PBS. Na dvou pracovištích byl celý inaktivovaný vzorek naočkován a testován na růst pomocí systému BACTEC™ MGIT™ 320 Mycobacterial Detection System (Becton Dickinson). Na třetím pracovišti byla testována životaschopnost MTB na pevném médiu Löwenstein-Jensen (LJ). Žádný z inaktivovaných vzorků nevykazoval růst bakterií komplexu *M. tuberculosis* na konci 56denního inkubačního období.

Mez detekce (*Limit of Detection, LoD*)

Mez detekce testu **cobas**® MAI byla stanovena analýzou série ředění jednoho kmene *M. intracellulare* (ATCC® 13209™) a jednoho kmene *M. avium* (ATCC® 19075™) ve dvou poolovaných negativních klinických matricích – čerstvého sputa a sedimentů sputa/BAL. Panely hladin koncentrace plus prázdný vzorek byly testovány celkem v 72 replikátech pro každou koncentraci s použitím tří šarží reagentií testu **cobas**® MAI při větším počtu běhů, v různých dnech a s různou obsluhou a zařízeními.

Hodnota LoD pro *M. intracellulare* se pohybovala od 46,3 CFU/ml (sediment sputa/BAL) do 46,6 CFU/ml (čerstvé sputum).

Hodnota LoD pro *M. avium* se pohybovala od 43,5 CFU/ml (sediment sputa/BAL) do 44,9 CFU/ml (čerstvé sputum).

Inkluzivita

Inkluzivita testu **cobas**® MAI pro jedenáct členů komplexu *M. avium* byla potvrzena testováním celkem 25 kmenů.

Následující druhy byly detekovány a vygenerovaly pozitivní výsledky pro *M. intracellulare*:

- *M. intracellulare* (ATCC® 25130™, ATCC® 35763™, B99-03.25.0163, B99-04.23.0178, B00-08.20.1090, B99-05.19.0190, B98-10.30.0156)
- *M. arosiense* (E. Tortoli)
- *M. chimaera* (HO1421839)
- *M. colombiense* (DSM 45105)
- *M. indicus pranii* (DSM 45239)
- *M. marseillense* (CCUG 56325 T)

- *M. timonense* (11324/16)
- *M. vulneris* (DMS 45247)
- *M. yongonense* (B04-09.20.0164)

Následující druhy byly detekovány a vygenerovaly pozitivní výsledky pro *M. avium*:

- *M. avium* (N-315 a N-337, izolát kultur od japonských pacientů)
- *M. avium* subsp. *avium* (B95-X25 sérotyp 3, B95-25522 sérotyp 8, B95-18302 sérotyp 15, ATCC® 35718™)
- *M. avium* subsp. *hominissuis* (ITM 960255)
- *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (B98-11.02.0221)
- *M. avium* subsp. *silvaticum* (DSM 44157)
- *M. bouchodurhonense* (CCUG 56331)

Všechny kmeny byly detekovány při koncentraci 256 CFU/ml pro *M. intracellulare* a 241 CFU/ml pro *M. avium* s použitím vzorku typu sediment.

Preciznost

Vlastní preciznost na místě byla zkoumána pomocí panelu složeného z kultur *M. intracellulare* (ATCC® 13209™) a *M. avium* (ATCC® 19075™) naředěných ve dvou poolovaných negativních klinických matricích – čerstvého sputa a sedimentů sputa/BAL. Zdroje variability byly zkoumány na panelu se třemi hladinami koncentrace s použitím tří šarží reagensů testu cobas® MAI na dvou zařízeních v průběhu 12 dnů v celkem 24 bězích. Popis panelů pro stanovení preciznosti a pozorované míry positivity naleznete v Tab. 18 a Tab. 19. Všechny negativní položky panelu byly vyhodnoceny jako negativní v celé studii. Analýza směrodatné odchylky a procenta variačního koeficientu hodnot Ct z testů provedených u pozitivních členů panelu (viz Tab. 20 a Tab. 21) vykazovala celkovou hodnotu CV (%) v rozsahu od 1,5 do 2,7 % pro *M. intracellulare* a od 1,5 do 2,5 % pro *M. avium*.

Tab. 18 Souhrn preciznosti (intralaboratorní) – *M. intracellulare*

Cílová koncentrace	Počet testovaných	Počet pozitivních na MIN	Míra positivity na MIN	95% interval spolehlivosti	
				Dolní mez	Horní mez
M. intracellulare – čerstvé sputum					
Negativní	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
77,4 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
232 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
M. intracellulare – sediment					
Negativní	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
74,3 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
223 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

Tab. 19 Souhrn preciznosti (intralaboratorní) – *M. avium*

Cílová koncentrace	Počet testovaných	Počet pozitivních na MAV	Míra positivity na MAV	95% interval spolehlivosti	
				Dolní mez	Horní mez
M. avium – čerstvé sputum					
Negativní	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
88,0 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
264 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
M. avium – sediment					
Negativní	48	0	0,0 %	0,0 %	7,4 %
71,1 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %
213 CFU/ml	48	48	100,0 %	92,6 %	100,0 %

Tab. 20 Celkový průměr, směrodatné odchylky a variační koeficienty (%) pro prahovou hodnotu cyklu, panely pozitivní na *M. intracellulare*

Cílová koncentrace	Míra positivity	Průměrná Ct	V rámci jednoho běhu		Mezi jednotlivými běhy		Mezi jednotlivými dny		Mezi jednotlivými přístroji		Mezi jednotlivými šaržemi		Celkem	
			SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
M. intracellulare – čerstvé sputum														
77,4 CFU/ml	100,0 %	37,6	0,83	2,2	0,00	0,0	0,48	1,3	0,20	0,5	0,00	0,0	0,98	2,6
232 CFU/ml	100,0 %	36,5	0,74	2,0	0,47	1,3	0,33	0,9	0,00	0,0	0,29	0,8	0,98	2,7
M. intracellulare – sediment														
74,3 CFU/ml	100,0 %	38,1	0,56	1,5	0,34	0,9	0,00	0,0	0,17	0,4	0,13	1,8	0,69	1,8
223 CFU/ml	100,0 %	36,9	0,37	1,0	0,25	0,7	0,00	0,0	0,33	0,9	0,00	0,0	0,56	1,5

Tab. 21 Celkový průměr, směrodatné odchylky a variační koeficienty (%) pro prahovou hodnotu cyklu, panely pozitivní na *M. avium*

Cílová koncentrace	Míra positivity	Průměrná Ct	V rámci jednoho běhu		Mezi jednotlivými běhy		Mezi jednotlivými dny		Mezi jednotlivými přístroji		Mezi jednotlivými šaržemi		Celkem	
			SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
M. avium – čerstvé sputum														
88,0 CFU/ml	100,0 %	37,9	0,87	2,3	0,00	0,0	0,25	0,7	0,24	0,6	0,00	0,0	0,94	2,5
264 CFU/ml	100,0 %	36,4	0,48	1,3	0,40	1,1	0,35	1,0	0,16	0,4	0,00	0,0	0,73	2,0
M. avium – sediment														
71,1 CFU/ml	100,0 %	38,8	0,51	1,3	0,25	0,7	0,10	0,3	0,00	0,0	0,11	0,3	0,59	1,5
213 CFU/ml	100,0 %	37,5	0,50	1,3	0,34	0,9	0,40	1,0	0,00	0,0	0,12	0,3	0,74	2,0

Analytická specifická/zkřížená reaktivita

Panel 173 bakterií, plísní a virů, včetně těch, které se běžně nacházejí v dýchacích cestách, byl testován k vyhodnocení analytické specifickosti testu cobas® MAI. Organismy, které uvádí Tab. 22, byly testovány v koncentracích přibližně 1×10^6 jednotek/ml u bakterií a přibližně 1×10^5 jednotek/ml u virů. Testování bylo provedeno u každého potenciálně interferujícího organismu v nepřítomnosti i v přítomnosti cíle *M. intracellulare* / *M. avium* (při koncentraci 200 CFU/ml).

Žádný z organismů neinterferoval s výkonností testu vytvářením falešně pozitivních výsledků. Detekce cíle *M. intracellulare* / *M. avium* nebyla ovlivněna testovanými organismy s výjimkou *M. kansasii* a *M. szulgai* při hladinách koncentrace > 1E+05 CFU/ml a *M. gastri* při hladinách koncentrace > 1E+04 CFU/ml.

Potenciální zkřížená reaktivita *Histoplasma capsulatum*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* a *Mycobacterium suricattae* byla hodnocena *in silico*. Výsledky analýz *in silico* předpovídají nízkou pravděpodobnost amplifikace a detekce těchto organismů při použití testu cobas® MAI.

Tab. 22 Mikroorganismy testované na analytickou specifičnost/křížovou reaktivitu

Mikroorganismus	Koncentrace	Mikroorganismus	Koncentrace
<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>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium intermedium</i>	1,0E+06 CFU/ml
Adenovirus	1,0E+05 U/ml	<i>Mycobacterium kansasii</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium kumamotoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus cereus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium malmoeense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mantenii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacteroides fragilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium marinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bordetella parapertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bordetella pertussis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Burkholderia cepacia</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium orygis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida glabrata</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium simiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida krusei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Candida parapsilosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium szulgai</i>	1,0E+05 CFU/ml*
<i>Candida tropicalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium terrae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	1,0E+06 IFU/ml	<i>Mycobacterium triviale</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Citrobacter freundii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium vaccae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium xenopi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,0E+06 ccu/ml
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria lactamica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium xerosis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria mucosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Neisseria sicca</i>	1,0E+06 CFU/ml
Cytomegalovirus	1,0E+05 IFU/ml	<i>Nocardia asteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Eikenella corrodens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia farcinica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus avium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia nova</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Nocardia transvalensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Enterovirus typu 68/2007	1,0E+05 U/ml	<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>tigris</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,0E+06 geq/ml
<i>Escherichia coli</i> vytvářející CTX-M-15 ESBL	1,0E+06 CFU/ml	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,0E+06 CFU/ml

Mikroorganismus	Koncentrace	Mikroorganismus	Koncentrace
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Penicillium chermesinum</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Gordona rubropertinctus</i>	1,0E+06 geq/ml	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Prevotella melaninogenica</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus <i>Herpes simplex</i> typu 1	1,0E+05 kopii/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus <i>Herpes simplex</i> typu 2	1,0E+05 kopii/ml	<i>Proteus mirabilis</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus lidského imunodeficitu	1,0E+05 kopii/ml	<i>Proteus vulgaris</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus lidské chřipky A	1,0E+05 U/ml	<i>Providencia stuartii</i>	1,0E+06 CFU/ml
Virus lidské chřipky B	1,0E+05 U/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,0E+06 CFU/ml
Lidský metapneumovirus	1,0E+05 U/ml	<i>Rhizopus</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Lidský virus parainfluenzy typ 1	1,0E+05 U/ml	<i>Rhodococcus equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
Lidský virus parainfluenzy typ 2	1,0E+05 U/ml	Virus zarděnek	1,0E+05 U/ml
Lidský virus parainfluenzy typ 3	1,0E+05 U/ml	Virus rubeoly	1,0E+05 U/ml
Lidský virus parainfluenzy typ 4	1,0E+05 U/ml	Virus příušnic	1,0E+05 U/ml
Lidský respirační syncytiální virus A	1,0E+05 U/ml	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Dublin	1,0E+06 CFU/ml
Lidský respirační syncytiální virus B	1,0E+05 U/ml	<i>Scedosporium</i> spp.	1,0E+06 CFU/ml
Lidský rhinovirus 16	1,0E+05 U/ml	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella kingae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella flexneri</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Kingella oralis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Shigella sonnei</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> vytvářející karbapenemázu KPC-3	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella micdadei</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus constellatus</i> subsp. <i>constellatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus mitis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus mutans</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium bovis</i> subsp. <i>caprae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium canetti</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium caprae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptococcus uberis</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium celatum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces anulatus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chelonae</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Streptomyces griseus</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium chubuense</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Tsukamurella</i> spp.	1,0E+06 geq/ml
<i>Mycobacterium confluentis</i>	1,0E+06 CFU/ml	Varicella zoster virus	1,0E+05 kopii/ml
<i>Mycobacterium flavescens</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella atypica</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Veillonella parvula</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium fuerth</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Weissella paramesenteroides</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Mycobacterium gastr</i>	1,0E+04 CFU/ml*	-	-

* Hladina, při níž nebyla pozorována žádná interference s detekcí *M. intracellulare* a *M. avium*, testovaná také při koncentraci 1,0E+06 CFU/ml, která vykazovala interferenci s cíli *M. intracellulare* i *M. avium*.

Interference

Byl hodnocen vliv exogenních látek potenciálně sekretovaných do respiračních vzorků (Tab. 23). Každá z potenciálně interferujících látek byla testována při klinicky relevantních hladinách nebo nad nimi v uměle vytvořených vzorcích sputa za nepřítomnosti a přítomnosti cílů *M. intracellulare* a *M. avium* (společně přidanych v koncentraci 200 CFU/ml).

Žádná z látek neinterferovala s výkonností testu vytvářením falešně negativních nebo falešně pozitivních výsledků.

Tab. 23 Seznam exogenních látek testovaných na interferenci

Látka	Koncentrace	Látka	Koncentrace
Albuterolsulfát	0,5 µg/ml	Kanamycin monosulfát	240 µg/ml
Amikacin	80,1 µg/ml	Levofloxacin	5 mg/ml
Amoxicilin	86,4 µg/ml	Lidokain HCl	1,2 % (hm./obj.)
Beklometason	3459 pg/ml	Mentol	0,50 % (hm./obj.)
Benzokain	1,2 % (hm./obj.)	Methylsalicylát	0,06 % (obj.)
Budesonid	3 mg/ml	Mometason	100 µg/ml
Devětsil	225 mg/ml	Moxifloxacin	15 µg/ml
Kapreomycin	80 µg/ml	Mupirocin	5 % (hm./obj.)
Cetylpyridiniumchlorid	0,5 % (hm./obj.)	NaCl	5 % (hm./obj.)
Chlorhexidinglukonát	1 % (obj.)	Nikotin	1 µg/ml
Cykloserin	105 µg/ml	Nystatin	1 % (obj.)
Klaritromycin	20 µg/ml	Oxymetazolin	12 ng/ml
Dexamethason	601 ng/ml	Pentamidin	1366 ng/ml
Efedrinhydrochlorid	1 mg/ml	Fenylefrin	5 mg/ml
Epinefrin	100 pg/ml	Prednisolon	3 µg/ml
Ethambutol	50 µg/ml	Pyrazinamid	240 µg/ml
Ethionamid	15 µg/ml	Rifampicin	25 µg/ml
Eukalyptol	0,002 % (obj.)	Extrakt z kopřivy (500 mg)	5 mg
Flunisolid	400 µg/ml	Streptomycin	240 µg/ml
Flutikason-propionát	5 µg/ml	Síra	0,01 % (hm./obj.)
Formoterolfumarát-dihydrát	66 µg/ml	Olej z čajovníku australského	0,50 % (obj.)
Kořen vodilky kanadské (kapsle 570 mg)	5,7 mg	Theofylin	20 µg/ml
Guaifenesin	5 mg/ml	Tobramycin	24,1 µg/ml
Isoniazid	50 µg/ml	Zanamivir	10 mg/ml

Endogenní látky, které mohou být přítomny v respiračních vzorcích, byly testovány na interferenci (Tab. 24). Každá z potenciálně interferujících látek byla testována při klinicky relevantních hladinách nebo nad nimi v uměle vytvořených vzorcích sputa za nepřítomnosti a přítomnosti cílů *M. intracellulare* a *M. avium* (společně přidanych v koncentraci 200 CFU/ml).

Žádná z látek neinterferovala s výkonností testu vytvářením falešně pozitivních výsledků. Žádná z látek s výjimkou 5% mucinu neinterferovala s výkonností testu vytvářením falešně negativních výsledků. U mucinu nebyla pozorována žádná interference při koncentracích 4 % a nižších.

Tab. 24 Seznam endogenních látek testovaných na interferenci

Látka	Koncentrace	Látka	Koncentrace
Žaludeční šťávy	10 % (obj.)	Mucin	4 %*
Hemoglobin	2 g/l	Hnis	5 %
Lidská plná krev	5 % (obj.)	Sliny	10 % (obj.)
hDNA	4 mg/l	-	-

* Hladina, při níž nebyla pozorována žádná interference s detekcí *M. intracellulare* a *M. avium*, testovaná také při koncentraci 5 %, která vykazovala částečnou interferenci s cíli *M. intracellulare* i *M. avium*.

Selhání celého systému

Vzorky testované ve studii selhání celého systému byly uměle vytvořené vzorky sputa a sedimentu sputa, které byly společně obohaceny o cíle *M. intracellulare* a *M. avium* na koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ příslušné matrice. Z této studie vyplynulo, že všechny replikáty byly platné a pozitivní na *M. intracellulare* a *M. avium*, což znamená výslednou míru selhání celého systému ve výši 0 % s horním jednostranným 95% intervalem spolehlivosti 3,0 %.

Křížová kontaminace

Byly provedeny studie k vyhodnocení případné křížové kontaminace v systémech **cobas®** 6800/8800 při použití testu **cobas®** MAI s použitím souvisejícího testu **cobas®** MTB s identickými typy vzorků a pracovními postupy. Křížová kontaminace může způsobit falešně pozitivní výsledky. V této studii výkonnosti bylo zjištěno, že míra křížové kontaminace mezi vzorky je 0,0 % (0/240) při střídavém testování velmi vysoce pozitivních a negativních vzorků ve více bžích. Testování bylo provedeno pomocí uměle vytvořených vzorků sedimentu sputa, které byly obohaceny o cílový komplex MTB v množství 2×10^6 CFU/ml, což je koncentrace vzorku, která generuje hodnoty Ct dříve než 95 % vzorků od infikovaných pacientů v uvažované populaci.

Výkonnost s klinickými vzorky

Výkonnost testu **cobas®** MAI při použití klinických vzorků byla hodnocena testováním archivovaných vzorků (čerstvého sputa, sedimentů sputa/BAL) od subjektů ve věku alespoň 18 let s předpokládanou mykobakteriální infekcí dýchacích cest odebraných v Německu, Japonsku, Jižní Africe, Švýcarsku a Texasu. Bylo provedeno souběžné srovnávací testování s testem COBAS® TaqMan® MAI. Citlivost a specifita byly stanoveny srovnáním s výsledky mykobakteriální kultivace. Populace pacientů pro účely citlivosti se skládala z 51 vzorků s negativním AFB nátěrem (49 %), 13 s chudým AFB nátěrem (13 %), 19 s AFB nátěrem 1+ (18 %), 15 s AFB nátěrem 2+ (14 %), 4 s AFB nátěrem 3+ (4 %) a 2 s nejednoznačným AFB nátěrem (2 %) v případě sedimentů sputa/BAL s celkem 81 sedimenty sputa a 23 sedimenty BAL. V případě čerstvého sputa bylo testováno 26 vzorků s negativním AFB nátěrem (47 %), 5 s chudým AFB nátěrem (9 %), 8 s AFB nátěrem 1+ (15 %), 12 s AFB nátěrem 2+ (22 %) a 4 s AFB nátěrem 3+ (7 %).

Výsledky uvádí Tab. 25.

Tab. 25 Citlivost a specifická citlivost testu **cobas® MAI** při použití klinických vzorků

				Roche cobas® MAI	Roche COBAS® TaqMan® MAI
Citlivost	Čerstvé sputum	MIN K +	MIN	16/24 66,7 % [44,7–84,4 %]	N/A
		MAV K +	MAV	27/31 87,1 % [70,1–96,3 %]	N/A
		MIN a/n MAV K +	MIN/MAV	44/55 80,0 % [67,0–89,6 %]	N/A
	Sediment	MIN K +	MIN	27/46 58,7 % [43,2–73,0 %]	32/46 69,6 % [54,2–82,3 %]
		MAV K +	MAV	35/58 60,3 % [46,6–72,9 %]	36/58 62,1 % [48,4–74,5 %]
		MIN a/n MAV K +	MIN/MAV	62/104 59,6 % [49,5–69,1 %]	68/104 65,4 % [55,4–74,4 %]
Specifická citlivost	Čerstvé sputum	MIN K -	MIN	350/350 100,0 % [99,0–100,0 %]	N/A
		MAV K -	MAV	350/350 100,0 % [99,0–100,0 %]	N/A
		MIN a MAV K -	MIN/MAV	350/350 100,0 % [99,0–100,0 %]	N/A
	Sediment	MIN K -	MIN	412/412 100,0 % [99,1–100,0 %]	408/412 99,0 % [97,5–99,7 %]
		MAV K -	MAV	412/412 100,0 % [99,1–100,0 %]	411/412 99,8 % [98,7–100,0 %]
		MIN a MAV K -	MIN/MAV	412/412 100,0 % [99,1–100,0 %]	407/412 98,8 % [97,2–99,6 %]

				Roche cobas® MAI	Roche COBAS® TaqMan® MAI
PPV	Čerstvé sputum	MIN PCR +	MIN	16/16 100,0 % [79,4–100 %]	N/A
		MAV PCR +	MAV	27/27 100,0 % [87,2–100 %]	N/A
		MIN a/n MAV PCR +	MIN/MAV	44/44 100,0 % [92,0–100 %]	N/A
	Sediment	MIN PCR +	MIN	27/27 100,0 % [87,2–100 %]	32/36 88,9 % [73,9–96,9 %]
		MAV PCR +	MAV	35/35 100,0 % [90,0–100 %]	36/37 97,3 % [85,8–99,9 %]
		MIN a/n MAV PCR +	MIN/MAV	62/62 100,0 % [94,2–100 %]	68/73 93,2 % [84,7–97,7 %]
NPV	Čerstvé sputum	MIN PCR -	MIN	350/358 97,7 % [95,6–99,0 %]	N/A
		MAV PCR -	MAV	350/354 98,9 % [97,1–99,7 %]	N/A
		MIN a/n MAV PCR -	MIN/MAV	350/361 96,7 % [94,6–98,5 %]	N/A
	Sediment	MIN PCR -	MIN	412/431 95,6 % [93,2–97,3 %]	408/422 96,7 % [94,5–98,2 %]
		MAV PCR -	MAV	412/435 94,7 % [92,2–96,6 %]	411/433 94,9 % [92,4–96,7 %]
		MIN a/n MAV PCR -	MIN/MAV	412/454 90,7 % [87,7–93,3 %]	407/443 91,9 % [88,9–94,2 %]

K = kultura, MIN = *Mycobacterium intracellulare*, MAV = *Mycobacterium avium*, a/n = a/nebo

Doplňující informace

Hlavní parametry testu

Typy vzorků

- Čerstvé sputum
- Sedimenty sputa a BAL po ošetření NALC-NaOH

Zpracované množství vzorku

- V případě čerstvého sputa je vyžadováno $\geq 0,4$ ml patientského vzorku upraveného roztokem MIS v poměru 1 : 2 (celkový objem $\geq 1,2$ ml) ve vzorkové zkumavce; přístroj zpracuje 0,85 ml.
- V případě sedimentu sputa/BAL je vyžadováno $\geq 0,2$ ml patientského vzorku upraveného roztokem MIS v poměru 1 : 5 (celkový objem $\geq 1,2$ ml) ve vzorkové zkumavce; přístroj zpracuje 0,85 ml.

Symbols

V označování diagnostických produktů společnosti Roche PCR se používají následující symboly.

Tab. 26 Symboly použité při označování diagnostických produktů PCR společnosti Roche

 Věk nebo datum narození	 Prostředek není pro testování v místě péče o pacienta	 QS IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (UI) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.
 Pomocný software	 Prostředek není určen pro samotestování	 Sériové číslo
 Přiřazené rozmezí (kopie/mL)	 Distributor (Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.)	 Pracoviště
 Přiřazené rozmezí (IU/mL)	 Nepoužívat opakovaně	 Standardní postup
 Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství	 Žena	 Sterilizováno ethylenoxidem
 Datový list s čárovými kódy	 Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD	 Uchovávejte v temnu
 Číslo šarže	 Globální číslo obchodní položky	 Omezení teploty
 Biologická rizika	 Dovozce	 Definiční soubor testu
 Katalogové číslo	 Zdravotnický prostředek pro diagnostiku <i>in vitro</i>	 Neklopit
 Označení CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro označení CE pro diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>	 Dolní mez přiřazeného rozmezí	 Ultracitlivý postup
 Datum odběru	 Muž	 Jedinečná identifikace prostředku
 Čtěte pokyny k použití	 Výrobce	 Horní mez přiřazeného rozmezí
 Obsah vystačí pro $<n>$ testů	 Negativní kontrola	 Hladina pro naplnění moči
 Obsah soupravy	 Nesterilní	 Pro USA: Pozor: podle federálního zákona smí být tento prostředek prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.
 Kontrola	 Jméno pacienta	 Datum expirace
 Datum výroby	 Číslo pacienta	
 Prostředek pro testování v místě péče o pacienta	 Zde odloupnout	
 Prostředek pro samotestování	 Pozitivní kontrola	
	 Kopie QS na reakci PCR, použijte kopie QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.	

Technická podpora

Pro technickou podporu (asistenci) kontaktujte místní zastoupení:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Výrobce

Tab. 27 Výrobce

Vyrobeno ve Spojených státech



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

Vyrobeno v USA

Ochranné známky a patenty

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

Autorská práva

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Literatura

1. Goslee S, Wolinsky E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1976;113:287-92.
2. Wolinsky E, Ryneerson TK. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *Am Rev Respir Dis*. 1968;97:1032-7.
3. Chapman JS. The ecology of the atypical mycobacteria. *Arch Environ Health*. 1971;22:41-6.
4. Gruft H, Falkinham JO, 3rd, Parker BC. Recent experience in the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev Infect Dis*. 1981;3:990-6.
5. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
6. Cayrou C, Turenne C, Behr MA, Drancourt M. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing. *Microbiology (Reading)*. 2010;156:687-94.
7. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:727-52.
8. Saito H, Tomioka H, Sato K, Tasaka H, Dawson DJ. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *J Clin Microbiol*. 1990;28:1694-7.
9. Horsburgh Jr CR. Epidemiology of *Mycobacterium avium* complex disease. *Am J Med*. 1997;102:11-5.
10. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2009;49:e124-9.
11. Maugein J, Dailloux M, Carbonnelle B, et al. Sentinel-site surveillance of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2005;26:1092-6.
12. Freeman J, Morris A, Blackmore T, et al. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease in New Zealand, 2004. *N Z Med J*. 2007;120:U2580.
13. 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.
14. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7.
15. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.
16. World Health Organization. *Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual*. WHO: Geneva, Switzerland; 2012.
17. 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.
18. 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.
19. Kent PT, Kubica GP. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*: Centers for Disease Control: Atlanta, GA; 1985.

Revize dokumentu

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 2.0 05/2024	Aktualizace pokynů k biologické bezpečnosti s ohledem na soulad s místními předpisy, gramatické opravy a údaje/reference WHO. Text „ve věku alespoň 18 let“ byl přesunut z části Procesní omezení do části Výkonnost s klinickými vzorky. Bylo aktualizováno označení značkou cobas®. Bylo aktualizováno prohlášení o příslušném úřadu. Z přední strany byl vypuštěn symbol „Rx Only“. Aktualizovaná stránka s harmonizovanými symboly. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.
Doc Rev. 3.0 12/2024	Přidána informace o verzi 2.0 softwaru systémů cobas® 6800/8800. Aktualizováno zobrazení vzorových výsledků v systémech cobas® 6800/8800 se softwarem verze 1.4. Odstraněna P/N spotřebního materiálu, podrobné informace o spotřebním materiálu jsou uvedeny v Asistentu uživatele systému cobas® 5800 a systémů cobas® 6800/8800. Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte zástupce společnosti Roche.

Shrnutí sestavy o bezpečnosti a výkonnosti najdete na této webové adrese: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>