

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	9
Požadavky na uchovávání reagentů a manipulaci s nimi.....	10
Požadavky na manipulaci s reagenty pro systém cobas® 5800.....	10
Požadavky na manipulaci s reagenty pro systémy cobas® 6800/8800.....	11
Další materiály potřebné pro systém cobas® 5800	11
Další materiály potřebné pro systémy cobas® 6800/8800	12
Požadované zařízení a software.....	13
Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci.....	14
Varování a bezpečnostní opatření.....	14
Manipulace s reagenty.....	15
Správná laboratorní praxe.....	15
Odběr, přeprava a uchovávání vzorků.....	16
Vzorky.....	16
Přeprava a uchovávání vzorků.....	16
Uchovávání inaktivovaných vzorků	16
Pokyny k použití	16
Procesní poznámky.....	16
Zpracování vzorku čerstvého sputa	19
Zpracování sedimentů sputa a BAL.....	19
Sonikace vzorků.....	20
Provedení testu cobas® MAI v systému cobas® 5800.....	21
Provedení testu cobas® MAI v systémech cobas® 6800/8800.....	23

Výsledky	24
Kontrola kvality a platnost výsledků v systému cobas® 5800	24
Výsledky kontrol v systému cobas® 5800	24
Kontrola kvality a platnost výsledků v systémech cobas® 6800/8800	24
Vyhodnocení výsledků	25
Vyhodnocení výsledků v systému cobas® 5800	25
Vyhodnocení výsledků v systémech cobas® 6800/8800	26
Procesní omezení	27
Vyhodnocení výkonnosti	29
Hlavní funkční charakteristiky prováděné na systémech cobas® 6800/8800	29
Inaktivace vzorků.....	29
Mez detekce (<i>Limit of Detection</i> , LoD)	29
Inkluzivita	29
Přesnost.....	30
Analytická specifita/zkřížená reaktivita	31
Interference.....	34
Selhání celého systému.....	35
Křížová kontaminace	35
Výkonnost s klinickými vzorky	35
Ekvivalence systému/porovnání systémů	37
Doplňující informace	38
Hlavní parametry testu	38
Symboly	39
Technická podpora	40
Výrobce.....	40
Ochranné známky a patenty	40
Autorská práva.....	40
Literatura	41
Revize dokumentu.....	42

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. mantenii*, *M. vulneris*, *M. yongonense*.^{6,7} Existuje 28 sérovarů *M. avium* a *M. intracellulare*⁸, 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, vlasatobuněčnou 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 stihlých 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 bronchiektázií 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 nukleové kyseliny a purifikace) 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 jedno integrované zařízení. Systém **cobas**® 6800/8800 se skládá z modulu pro dodávání vzorků, přenosového modulu, procesního 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 zprávu.

Extrakce nukleové kyseliny ze vzorků pacientů, externích kontrol a přidanych molekul vnitřní 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 přidanych magnetických partikulí. 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 partikulí 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 vnitřní kontroly DNA-IC ve třech různých cílových kanálech.^{14, 15} Fluorescenční signály intaktních sond, které nejsou navázané 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 vnitřní kontroly DNA-IC.

Reagencie a materiály

Reagencie a kontroly cobas® MAI

Materiály dodávané pro test cobas® MAI uvádí Tab. 1. Všechny neotevřené reagencie a kontroly mají být uchovávány v souladu s doporučeními v Tab. 1 až Tab. 4. Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky, uvádí Tab. 2 až Tab. 4 a Tab. 8 až Tab. 10.

Tab. 1 cobas® MAI

cobas® MAI

Uchovávat při 2–8 °C

Kazeta pro 384 testů (P/N 09040595190)

Součásti soupravy	Složky reagentů	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 nepřibuzný 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 vnitřní kontroly, < 0,01 % upstream a downstream primery MAI, < 0,01 % fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro MAI a vnitřní 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 (P/N 09040609190)

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

Součásti soupravy	Složky reagentů	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 pufrované kontroly cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Uchovávat při 2–8 °C

Pro použití se systémem cobas® 5800 (P/N 09051953190)

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

Součásti soupravy	Složky reagensí	Množství v soupravě
Souprava negativní pufrované 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 cobas® omni pro přípravu vzorků*

Reagencie	Složky reagentů	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování**
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997546190)	Magnetické 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.) guanidinthio- kyanát***, 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

* Testovací souprava cobas® MAI neobsahuje tato reagenty. Viz seznam dalších požadovaných materiálů (Tab. 8 až Tab. 10).

** Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

*** Nebezpečná látka nebo směs.

Požadavky na uchovávání reagensů a manipulaci s nimi

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 Uchovávání reagensů (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 reagensy pro systém **cobas® 5800**

Reagencie vložené do systému **cobas® 5800** jsou uloženy při příslušných teplotách a systém monitoruje jejich dobu použitelnosti. Systém umožní používání reagensů pouze tehdy, pokud jsou splněny podmínky, které uvádí Tab. 6. Systém automaticky znemožňuje použití expirovaných reagensů. Tab. 6 vysvětluje uživatelům podmínky manipulace s reagensy, platné v systému **cobas® 5800**.

Tab. 6 Podmínky doby expirace reagensů v systému **cobas® 5800**

Reagencie	Datum expirace soupravy	Stabilita otevřené soupravy	Počet běhů, pro který může být tato souprava použita	Stabilita v systému
cobas® MAI	Doba zatím neuplynula	90 dnů od prvního použití	Maximálně 40 běhů	Maximálně 36 dní ^b
cobas® MAI Positive Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se ^a	Nevztahuje se	Maximálně 36 dní ^b
cobas® Buffer Negative Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se ^a	Nevztahuje se	Maximálně 36 dní ^b
cobas® omni Lysis Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni MGP Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni Specimen Diluent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni Wash Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se

^a Reagencie na jedno použití.

^b Čas se měří od doby, kdy byla reagencie poprvé vložena do systému **cobas® 5800**.

Požadavky na manipulaci s reagensciemi pro systémy cobas® 6800/8800

Reagencie vložené do systémů cobas® 6800/8800 jsou uloženy při příslušných teplotách a systém monitoruje jejich dobu použitelnosti. Systémy cobas® 6800/8800 umožní používání reagenscií pouze pokud jsou splněny všechny podmínky, které uvádí Tab. 7. Systém automaticky znemožňuje použití expirovaných reagenscií. Tab. 7 vysvětluje uživateli podmínky manipulace s reagensciemi, platné v systémech cobas® 6800/8800.

Tab. 7 Podmínky dodržování doby použitelnosti reagenscií v systémech cobas® 6800/8800

Reagencie	Datum expirace soupravy	Stabilita otevřené soupravy	Počet běhů, pro který může být tato souprava použita	Stabilita na palubě (celková doba na palubě mimo chlazené úložiště)
cobas® MAI	Doba zatím neuplynula	90 dnů od prvního použití	Maximálně 40 běhů	Maximálně 40 hodin
cobas® MAI Positive Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se ^a	Nevztahuje se	Maximálně 10 hodin
cobas® Buffer Negative Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se ^a	Nevztahuje se	Maximálně 10 hodin
cobas® omni Lysis Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni MGP Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni Specimen Diluent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas® omni Wash Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení ^b	Nevztahuje se	Nevztahuje se

^a Reagencie na jedno použití.

^b Čas se měří od doby, kdy byla reagencie poprvé vložena do systémů cobas® 6800/8800.

Další materiály potřebné pro systém cobas® 5800

Tab. 8 Materiály a spotřební materiál pro použití v systémech cobas® 5800

Materiál	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Špičky CORE TIPS s filtrem, 1 ml	04639642001
Špičky CORE TIPS s 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
Pytel na pevný odpad nebo Pytel na pevný odpad s vložkou	07435967001 nebo 08030073001

Další materiály potřebné pro systémy cobas® 6800/8800

Tab. 9 Materiály a spotřební materiál pro použití v systémech cobas® 6800/8800

Materiál	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
Pytel na pevný odpad a nádoba na pevný odpad nebo Pytel na pevný odpad s vložkou a pokročilá verze odpadní zásuvky	07435967001 a 07094361001 nebo 08030073001 a 08387281001

Tab. 10 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)
Vortex
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 a/nebo uživatelských příručkách k systémům 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 zařízení.

Požadované zařízení a software

V zařízení **cobas**® 5800 musí být nainstalován software systému **cobas**® 5800 a analytický balíček **cobas**® MAI pro systém **cobas**® 5800. Se systémem bude dodán software Data Manager a počítač pro systém **cobas**® 5800.

V zařízeních **cobas**® 6800/8800 musí být nainstalován software systémů **cobas**® 6800/8800 a analytický balíček **cobas**® MAI pro systémy **cobas**® 6800/8800. Se systémem je poskytnut server Instrument Gateway (IG).

Tab. 11 Zařízení

Vybavení	P/N
Systém cobas ® 5800	08707464001
Systém cobas ® 6800 (pohyblivá platforma)	06379672001
Systém cobas ® 6800 (pevná platforma)	05524245001
Systém cobas ® 8800	05412722001
Modul zabezpečující vzorky	06301037001

Další informace naleznete v Asistentu uživatele nebo v uživatelské příručce k systému **cobas**® 5800 nebo systémům **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 senzitivitě testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi reagenciemi 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 a po inaktivaci 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.
- Pokud dojde k rozlití vzorků upravených roztokem MIS (který obsahuje guanidinthiokyanát), látka se nesmí dostat do styku s dezinfekčními prostředky s obsahem chlornanu sodného, jako je bělidlo. Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.
- Dojde-li k rozlití 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 guanidinthiokyanát. 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 ani roztok MIS obsahující guanidinthiokyanát se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělidlo). Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.
- Použité kontrolní soupravy obsahují propíchnuté vialky se zbytky reagensií; je třeba dbát zvláštní opatrnosti a vyhnout se rozlití 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 materiál, 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 plášť 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 0,6% roztokem chlornanu sodného nebo draselného v destilované nebo deionizované vodě. Dále povrch otřete 70 % etanolem.
- Pokud dojde k rozlití kapaliny na systémy **cobas®** 5800/6800/8800, řádně povrch zařízení vyčistěte a dekontaminujte podle pokynů v Asistentu uživatele nebo uživatelské příručce k systému **cobas®** 5800 nebo systémům **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.
- 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 a/nebo uživatelských příručkách k systémům **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 zařízení najdete v Asistentu uživatele nebo uživatelské příručce systému **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. 12 pro vzorky čerstvého sputa a Tab. 13 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. 12 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 systému cobas® 6800/8800 a spusťte běh s použitím vzorku typu čerstvé sputum.

Tab. 13 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 zkušavky 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 protřeptejte 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 protřeptejte 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. 14.

- 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. 14.

- 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. 14 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 stojánku 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 stojánků 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 stojánku 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 stojánu 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 systému **cobas® 5800**

Test **cobas® MAI** lze provádět s minimálním objemem vzorku 1,2 ml, z čehož je zpracováno 850 µl. Postup testu je podrobně popsán v Asistentu uživatele nebo uživatelské příručce systému **cobas® 5800**. Obr. 2 níže uvádí souhrn postupu.

- 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).

Pozn.: vortexujte vzorky po 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 • 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, které splňují požadavky minimálního objemu, budou-li třeba pro budoucí použití Vyčistěte zařízení: • Vyjměte prázdné ministožany s kontrolami • Vyjměte prázdné reagenční kazety specifické pro test • Vyprázdněte zásuvku pro amplifikační destičky • Vyprázdněte kapalný odpad • Vyprázdněte pevný odpad

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

Test cobas® MAI lze provádět s minimálním požadovaným objemem vzorku 1,2 ml, z čehož je zpracováno 850 µl. Provoz zařízení je podrobně popsán v Asistentu uživatele a Uživatelské příručce k systémům cobas® 6800/8800. Obr. 3 níže uvádí souhrn postupu.

- Před otevřením zkumavek a vložením vzorků do systémů cobas® 6800/8800 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).

Pozn.: vortexujte vzorky po 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 systémech cobas® 6800/8800.

Obr. 3 Postup testu cobas® MAI v 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 reagenty MGP • Vložte destičky pro amplifikaci • Doplňte ředidlo • Doplňte lyzační reagenty • Doplňte promývací reagenty
3	Vkládání vzorků do systému • Pro každý vzorek ◦ Otevřete zkumavku ◦ Umístěte zkumavku do stojánu • Vložte vzorkový stojánek a stojánek pro ucpané špičky do modulu zabezpečujícího vzorky v systému • Potvrďte, že vzorky byly přijaty do přenosového modulu
4	Spusťte běh
5	Zkontrolujte a exportujte výsledky
6	Vyjměte a uzavřete víčkem vzorkové zkumavky, které splňují požadavky minimálního objemu, budou-li třeba pro budoucí použití Vyčistěte zařízení • 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

- Nejméně každých 72 hodin a s každou novou šarží soupravy musí být zpracována jedna negativní kontrola [(-) Ctrl] a jedna pozitivní kontrola [MAI (+) C]. Pozitivní nebo negativní kontroly lze plánovat častěji na základě laboratorních postupů nebo místních předpisů.
- Ověřte platnost výsledku v softwaru **cobas**® 5800 a/nebo ve zprávě tak, že zkontrolujete značky (Flags) a související výsledky.

Systém **cobas**® 5800 vyhláší neplatnost výsledků automaticky na základě selhání negativních nebo pozitivních kontrol.

POZN.: systém **cobas**® 5800 se dodává se standardním nastavením soupravy kontrol (pozitivní a negativní) pro každý běhu, ale kontroly lze nakonfigurovat s menší četností až do intervalu 72 hodin na základě laboratorních postupů a/nebo místních předpisů. Další informace vám poskytne servisní technik společnosti Roche a/nebo zákaznická technická podpora společnosti Roche.

Výsledky kontrol v systému cobas® 5800

Výsledky kontrol jsou uvedeny v softwaru **cobas**® 5800 v aplikaci „Controls“ (Kontroly).

- Pokud jsou všechny cíle kontroly nahlášeny jako platné, jsou ve sloupci „Control result“ (Výsledek kontroly) označeny „Valid“ (Platné). Kontroly jsou označeny „Invalid“ (Neplatné) ve sloupci „Control result“, pokud jsou všechny cíle nebo jeden cíl kontroly nahlášeny jako 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.

Kontrola kvality a platnost výsledků v systémech cobas® 6800/8800

- S každou dávkou pro požadovaný typ výsledku je zpracována jedna negativní kontrola [(-) Ctrl] a jedna pozitivní kontrola [MAI (+) C].
- Ověřte platnost dávky v softwaru systémů **cobas**® 6800/8800 a/nebo ve zprávě tak, že zkontrolujete značky (Flags) a související výsledky.
- Všechny značky jsou popsány v Asistentu uživatele a Uživatelské příručce systémů **cobas**® 6800/8800.
- Dávka je platná, pokud se u obou kontrol neobjeví žádné značky. Pokud je dávka neplatná, opakujte testování celé dávky.

Validace výsledků dávek je prováděna automaticky softwarem systémů **cobas**® 6800/8800 na základě výsledku negativních a pozitivních kontrol; validace výsledků jednotlivých vzorků je prováděna softwarem systémů **cobas**® 6800/8800 na základě výsledků vnitřních kontrol.

Vyhodnocení výsledků

Výsledky a jejich odpovídající interpretace pro detekci MAI obsahuje Tab. 15.

Tab. 15 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

Výsledky vzorků jsou uvedeny v softwaru cobas® 5800 v aplikaci „Results“ (Výsledky).

U běhu s platnými kontrolami zkontrolujte u všech individuálních vzorků přítomnost značek v softwaru cobas® 5800 a/nebo ve zprávě. Interpretace výsledků je následující:

- Vzorky související s platnou dávkou kontrol jsou ve sloupci „Control result“ (Výsledek kontroly) zobrazeny jako „Valid“ (Platné), pokud jsou všechny cílové výsledky kontrol hlášeny jako platné. Vzorky související s chybnou dávkou kontrol jsou ve sloupci „Control result“ zobrazeny jako „Invalid“ (Neplatné), pokud jsou všechny 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. 15 výše.
- Pokud má jeden či více cílových výsledků vzorku označení „Invalid“ (Neplatný), software **cobas® 5800** zobrazí značku ve sloupci „Flags“ (Značky). Další informace o tom, proč je výsledek vzorku nahlášen jako neplatný, včetně informací o značce, se zobrazí v detailním zobrazení.

Obr. 4 Příklad výsledků testu **cobas® MAI** v systému **cobas® 5800**

Sample ID	Test	Control result	Flag	Status	Result		Creation date/time
MIA_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**

U každé platné dávky zkontrolujte u všech individuálních vzorků přítomnost značek v software systémech **cobas® 6800/8800** nebo ve zprávě. 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**

Test	Sample ID	Valid	Flags	Sample type	Overall result	Target 1	Target 2
MAI 850 µl	MAI_R_0001	NA		Raw sputum	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI 850 µl	MAI_R_0002	NA		Raw sputum	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI 850 µl	MAI_R_0003	NA	P02T	Raw sputum	NA	Invalid	Invalid
MAI 850 µl	MAI_S_0001	NA		Sediment	NA	MIN Negative	MAV Positive
MAI 850 µl	MAI_S_0002	NA		Sediment	NA	MIN Positive	MAV Negative
MAI 850 µl	MAI_S_0003	NA	C02H1	Sediment	NA	Invalid	Invalid
MAI 850 µl	C161420284090428828404	Yes		(-) Ctrl	Valid	Valid	Valid
MAI 850 µl	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 systémů **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 inkluзивity 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 viry 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

Hlavní funkční charakteristiky prováděné na systémech cobas® 6800/8800

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. bouchedurhonense* (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.

Přesnost

Vlastní přesnost 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 reagentů testu cobas® MAI na dvou zařízeních v průběhu 12 dnů v celkem 24 bžích. Popis panelů pro stanovení přesnosti a pozorované míry positivity naleznete v Tab. 16 a Tab. 17. 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. 18 a Tab. 19) vykazala 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. 16 Souhrn přesnosti (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. 17 Souhrn přesnosti (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. 18 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 zařízeními		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. 19 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 zařízeními		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 specifita/zkřížená reaktivita

Panel 173 bakterií, plísní a virů, včetně těch, které se běžně nacházejí v dýchacích cestách, byl testován k vyhodnocení analytické specifity testu cobas® MAI. Organismy, které uvádí Tab. 20, 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. 20 Mikroorganismy testované na analytickou specifitu/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 kumamontense</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 malmoense</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	1,0E+06 CFU/ml	<i>Mycobacterium mantanii</i>	1,0E+06 CFU/ml
<i>Bactericides 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

Mikroorganismus	Koncentrace	Mikroorganismus	Koncentrace
<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
<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

Mikroorganismus	Koncentrace	Mikroorganismus	Koncentrace
<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 kopií/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 gastri</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. 21). 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 přidáných v koncentraci 200 CFU/ml).

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

Tab. 21 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. 22). 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 přidáných 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. 22 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. Senzitivita a specifita byly stanoveny srovnáním s výsledky mykobakteriální kultivace. Populace pacientů pro účely senzitivity 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. 23.

Tab. 23 Senzitivita a specificita testu **cobas® MAI** při použití klinických vzorků

				Roche cobas® MAI	Roche COBAS® TaqMan® MAI
Senzitivita	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 %]
Specificita	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

Ekvivalence systému/porovnání systémů

Ekvivalence systémů **cobas® 5800**, **cobas® 6800** a **cobas® 8800** byla prokázána ve studiích ekvivalence. Výsledky uvedené v Pokynech k použití odpovídají stejnému výkonu všech systémů.

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; zařízení 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; zařízení zpracuje 0,85 ml.

Symboly

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

Tab. 24 Symboly použité při označování diagnostických produktů PCR společnosti Roche

Age/DOB	Věk nebo datum narození		Prostředek není pro testování v místě péče o pacienta	QS IU/PCR	QS IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (UI) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.
	Pomocný software		Prostředek není určen pro samotestování	SN	Sériové číslo
Assigned Range [copies/mL]	Přiřazené rozmezí (kopie/mL)		Distributor (Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.)	Site	Pracoviště
Assigned Range [IU/mL]	Přiřazené rozmezí (IU/mL)		Nepoužívat opakovaně	Procedure Standard	Standardní postup
EC REP	Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství		Žena	STERILE EO	Sterilizováno ethylenoxidem
BARCODE	Datový list s čárovými kódy		Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD		Uchovávejte v temnu
LOT	Číslo šarže	GTIN	Globální číslo obchodní položky		Omezení teploty
	Biologická rizika		Dovozce		Definiční soubor testu
REF	Katalogové číslo	IVD	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>	LLR	Dolní mez přiřazeného rozmezí	Procedure UltraSensitive	Ultracitlivý postup
Collect Date	Datum odběru		Muž	UDI	Jedinečná identifikace prostředku
	Čtěte pokyny k použití		Výrobce	ULR	Horní mez přiřazeného rozmezí
	Obsah vystačí pro <n> testů	CONTROL -	Negativní kontrola	Urine Fill Line	Hladina pro naplnění močí
CONTENT	Obsah soupravy		Nesterilní	Rx Only	Pouze pro USA: podle federálního zákona smí být tento prostředek prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.
CONTROL	Kontrola		Jméno pacienta		Datum expirace
	Datum výroby		Číslo pacienta		
	Prostředek pro testování v místě péče o pacienta		Zde odloupnout		
	Prostředek pro samotestování	CONTROL +	Pozitivní kontrola		
		QS copies / PCR	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. 25 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, Rynearson 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.

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