



# COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0	CTM CT v2.0	48 Tests	P/N: 05055202 190
AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit	CT/NG PREP	100 Tests	P/N: 20759414 122 ART: 07 5941 4 US: 83315

**POZNÁMKA:** Díky koupi tohoto produktu může zákazník provádět amplifikaci a detekci sekvencí nukleové kyseliny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a příbuzných procesů s využitím diagnostiky *in vitro*. Tímto se neudílí žádný obecný patent ani jiná licence jakéhokoliv typu mimo toto konkrétní právo použití.

## ÚČEL POUŽITÍ

Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 je *in vitro* amplifikační test nukleové kyseliny pro kvalitativní detekci DNA *Chlamydia trachomatis* ve vzorcích endocervikálních výtěrů u žen nebo moči mužů i žen. Vzorky jsou zpracovávány pomocí sady pro přípravu vzorků AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit pro ruční přípravu vzorků a analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 pro automatizovanou amplifikaci a detekci.

## SOUHRN A VYSVĚTLENÍ TESTU

Chlamydie jsou gram-negativní, nepohyblivé bakterie, které se vyskytují jako obligátní nitrobuněční parazité eukaryotických buněk, neboť nemají schopnost syntetizovat ATP. Rod *Chlamydia* zahrnuje čtyři známé druhy: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pecorum* a *C. pneumoniae* (TWAR). *C. psittaci* je primárně zvířecí patogen a patogenní role *C. pecorum* není jasná<sup>1</sup>.

Infekce způsobená *Chlamydia trachomatis* je nyní uznávána jako druhá nejčastější příčina sexuálně přenosných chorob (STD) na celém světě s přibližně 89,1 miliónů případů ročně<sup>2</sup>. Ve Spojených státech se objevuje přibližně 2,8 miliónů případů ročně<sup>3</sup>. O *Chlamydia trachomatis* je známo, že vyvolává zánět děložního čípku, pánevní zánětlivé onemocnění (PID), zánět spojivek u dětí, dětskou pneumonii, zánět močové trubice, epididymitidu a proktitidu<sup>1,4</sup>. *Chlamydia trachomatis* je také nejčastější příčinou negonokokové uretritidy (NGU) u mužů (zhruba 25-55% případů). U neléčených žen jsou následky chlamydiální infekce závažné. Vzhledem k tomu, že zhruba polovina těchto infekcí je asymptomatických, zůstává mnoho případů onemocnění nezjištěno a tedy neléčeno, což vede k dalším komplikacím zvláště u těhotných žen. U dětí narozených matkám infikovaným chlamydiemi je vysoké riziko onemocnění inkluzním zánětem očních spojivek a pneumonií.

Testování na kulturách bylo tradičním referenčním standardem pro identifikaci *C. trachomatis*. Nicméně, obtíže standardizace, vysoká technická složitost a potřeba udržení organismu při životě během transportu a skladování před provedením kultivace vedla k vývoji testů pro *C. trachomatis*<sup>5</sup> nevyžadujících kulturu. Tyto metody, které nevyžadují živé organismy, zahrnují amplifikační testy nukleové kyseliny (NAAT), testy sondy nukleové kyseliny, enzymovou imunoanalýzu (EIA testy), testy přímé fluorescence protilátek (DFA) a fixaci komplementu<sup>1,5</sup>. V klinických hodnoceních bylo prokázáno, že NAAT metody jsou více senzitivní než kultury a jiné metody nepoužívající kultury a staly se preferovanou metodou klinických laboratoří pro diagnózu infekcí *C. trachomatis*<sup>5</sup>.

## PRINCIPY PROCEDURY

Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 je založen na dvou základních postupech: (1) manuální příprava vzorku pro získání CT DNA; (2) simultánní PCR amplifikace<sup>6</sup> cílové DNA za použití CT specifických komplementárních primerů a detekce rozštěpených duálních fluorescenčních oligonukleotidových detekčních sond, které umožňují detekci amplifikačních produktů cílové CT (amplikon) a DNA vnitřní kontroly CT, která je amplifikována a detekována simultánně se vzorkem.

Činidlo Master Mix obsahuje páry primerů a sond, které jsou specifické pro CT DNA kryptického plazmidu, pro CT DNA chromozomální *ompA* gen a DNA vnitřní kontroly CT. Činidlo Master Mix bylo vyvinuto pro zajištění detekce všech 15 sérovarů CT. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a vnitřní kontrole specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci amplikonu CT a amplikonu vnitřní kontroly CT.

## Příprava vzorku

Urogenitální epitelové buňky odebrané na tamponcích nebo peletizované z moči se zpracují pomocí roztoku detergentu, aby uvolnily chlamydiální DNA obsaženou v chlamydiálních retikulárních těliscích. Přidáním roztoku dalšího detergentu se získá lýzovaný vzorek pro amplifikaci.

## PCR Amplifikace

### Volba cíle

Vedle chromozomální DNA obsahuje *C. trachomatis* kryptický plazmid se zhruba 7 500 páry bází, který je společný všem sérovarům *C. trachomatis*<sup>7,8</sup>. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 používá primery CP102 a CP103 k definování sekvence zhruba 206 nukleotidů v DNA kryptického plazmidu *C. trachomatis*. Kromě toho test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 používá primery CTMP101 a CTMP102 k definování sekvence zhruba 182 nukleotidů v chromozomální DNA *C. trachomatis*.

### Cílová amplifikace

Zpracované vzorky se přidají do amplifikační směsi v K-zkumavkách nebo K-zásobnících, ve kterých probíhá PCR amplifikace. Reakční směs je zahřána pro denuraci izolované DNA a tím se odhalí cílové sekvence pro primer. Při ochlazování směsi dochází k hybridizaci upstream a downstream primerů specificky na jedno vlákno DNA, Z05 primery polymerizuje a dochází k syntéze druhého vlákna DNA. Tím je dokončen první cyklus PCR, který vytváří kopie dvouvláknové DNA cílových oblastí CT DNA a DNA vnitřní kontroly CT. Reakční směs se opět zahřeje k oddělení výsledné dvouvláknové DNA a exponování cílových sekvencí primeru. Při chladnutí směsi se primery připojí k cílové DNA. Z05 DNA polymeráza v přítomnosti Mn<sup>2+</sup> a nadbytku dNTPs polymerizuje hybridizované primery podél cílových templátů za vzniku molekuly dvouvláknové DNA nazývané amplikon. Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 opakuje automaticky tento proces po určený počet cyklů, kdy při každém cyklu dojde ke zdvojení množství amplikonové DNA. Požadovaný počet cyklů se na analyzátoru COBAS® TaqMan® 48 předem naprogramuje. Amplifikace probíhá pouze v oblasti CT kryptického plazmidu, případně *ompA* chromozomálními oblastmi mezi primery; celý CT kryptický plazmid nebo chromozom amplifikován není.

### Amplifikace vnitřní kontroly

Při enzymatických amplifikačních postupech, jakým je PCR, se může účinnost snižovat v důsledku přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Zpracovávané vzorky, které obsahují látky, jež by mohly PCR amplifikaci rušit, je možno identifikovat pomocí vnitřní kontroly CT. Vnitřní kontrola CT je neinfekční rekombinantní plazmidová DNA se stejnými oblastmi vázajícími primer jako v cílové sekvenci *C. trachomatis* a s randomizovanou interní sekvencí podobné délky a složení bází jako u cílové sekvence *C. trachomatis* a s jedinečnou oblastí vázající sondu, kterou se vnitřní kontrola CT od cílového amplikonu odlišuje. Tyto charakteristiky byly zvoleny proto, aby se zajistila ekvivalentní amplifikace vnitřní kontroly CT a cílové DNA *C. trachomatis*. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 obsahuje činidlo vnitřní kontroly CT a to se zavádí do každé amplifikační reakce, kde se amplifikuje společně s cílovou DNA ze vzorku. Vnitřní kontrola CT slouží k tomu, aby bylo zajištěno, že vzorky neobsahují inhibitory rušící amplifikaci a detekci 20 nebo více kopií cílové nukleové kyseliny *C. trachomatis* podle Poissonovy analýzy.

### Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin<sup>9</sup>, ale nikoliv DNA obsahující deoxythymidin. Deoxyuridin se v přirozené DNA nevyskytuje, je však vždy přítomen v amplikonu, díky použití deoxyuridin-trifosfátu jako jednoho z dNTP v činidle Master Mix, takže deoxyuridin obsahuje pouze amplikon. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplikon citlivý vůči destrukci enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po iniciální aktivaci Master Mix manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažen v činidle Master Mix, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase je neaktivní při teplotě nad 55°C, tedy během tepelného cyklování, a proto nerozkládá cílový amplikon vytvořený během amplifikace.

### **Detekce produktů PCR v testu COBAS® TaqMan®**

Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 využívá v reálném čase běžící<sup>10,11</sup> PCR technologii. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. Sonden obsahují CT kryptický plazmid, CT *ompA* a oligonukleotidy specifické pro CT vnitřní kontrolu značené oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0, využívají sondy CT kryptického plazmidu a *ompA* stejné fluorescenční oznamovací barvivo a sonda CT vnitřní kontroly je značena fluorescenčním oznamovacím

barvivem, které je odlišné od sondy CT kryptického plazmidu i sondy *ompA*. Jsou-li tyto dvojitě fluorescenčně značené sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumivého barviva kvůli přenosovému vlivu energie Försterova typu. Při PCR hybridizují sondy s jejich příslušnými cílovými sekvencemi a jsou rozštěpeny 5' až 3' nukleázovou aktivitou termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumivý barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacích barviv se zvýší. Amplifikace CT kryptického plazmidu, případně cílové DNA *ompA*, jsou měřeny při různých vlnových délkách, nezávisle na DNA vnitřní kontroly CT. Tento proces je opakován po předem určený počet cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci CT DNA a DNA vnitřní kontroly CT.

## ČINIDLA

<b>AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit</b> Souprava pro přípravu vzorku AMPLICOR® CT/NG (P/N: 20759414 122; ART: 07 5941 4; US: 83315)	CT/NG PREP	<b>100 testů</b>
<b>CT/NG URINE WASH</b> (Promývací pufr na moč CT/NG) Pufr Tris-HCl 300 mM chlorid sodný < 0,1% Detergent 0,09% azid sodný		1 x 50 ml
<b>CT/NG LYS</b> (Lytické činidlo CT/NG) Pufr Tris-HCl < 1% rozpouštědlo 0,09% azid sodný		1 x 25 ml
<b>CT/NG DIL</b> (Ředidlo na vzorky CT/NG) Pufr Tris-HCl 6 mM chlorid hořečnatý < 25% Detergent 0,05% azid sodný		2 x 50 ml
<b>COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0</b> (P/N: 05055202 190)	CTM CT v2.0	48 testů
<b>Kontrolní činidla</b>		
<b>CT IC</b> (Vnitřní kontrola CT) Pufr Tris-HCl 8 kopií/μl neinfekčního DNA plazmidu (mikrobiální) obsahující <i>C. trachomatis</i> vazebné sekvence primeru a unikátní vazebnou oblast sondy odpovídající přibližně 20 IC kopií/test < 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA Amarantové barvivo 0,05% azid sodný		3 x 0,1 ml
<b>CT (+) C, v2.0</b> [Kontrola <i>C. trachomatis</i> (+), v2.0] Pufr Tris-HCl 8,6 kopií/μl neinfekčního DNA plazmidu (syntetické) obsahující sekvence <i>C. trachomatis</i> odpovídající přibližně 20 kopiím/test < 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		1 x 0,75 ml
<b>CT (-) C, v2.0</b> [Kontrola <i>C. trachomatis</i> (-), v2.0] Pufr Tris-HCl < 0,005% Poly rA RNA (syntetická) EDTA 0,05% azid sodný		1 x 0,75 ml

## Amplifikační a detekční činidla

### CT MMX, v2.0

(COBAS® TaqMan® CT Master Mix, v2.0)

3 x 0,75 ml

Tricinový pufr

Hydroxid draselný

Acetát draselný

Glycerol

< 0,001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP

< 0,001% upstream a downstream primery pro CT kryptického plazmidu a CT *ompA*

< 0,001% fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro CT kryptického plazmidu, CT *ompA* a CT vnitřní kontroly

< 0,001% Aptamer

< 0,05% Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)

< 0,1% enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální)

0,09% azid sodný

### CT Mn<sup>2+</sup>

(COBAS® TaqMan® CT roztok manganu)

3 x 0,2 ml

< 1,0% Acetát manganatý

Ledová kyselina octová

0,09% azid sodný

## UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

### A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Výraz „kopie“ v této příručce značí 1 kopii cílové nukleové kyseliny *C. trachomatis*. Jedna (1) kopie je ekvivalentní nejmenšímu množství cílové nukleové kyseliny *C. trachomatis*, jež by v PCR testu poskytlo pozitivní výsledek.
- C. Tento test je určen pouze pro vyšetřování endocervikálních vzorků nebo vzorků moči. Tento test není určen pro vyšetřování vzorků z hrdla, rekta a dalších.
- D. Nepipetujte ústy.
- E. V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní plášť a prostředek ochrany očí. Po práci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- F. **Při odebrání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci.**
- G. **Doporučuje se používat jednorázových pipet a hrotů k pipetám.**
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- I. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav.
- J. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- K. Po uplynutí data expirace již soupravu nepoužívejte.
- L. Pravidla bezpečnosti při práci (MSDS) zašle na vyžádání vaše místní pobočka společnosti Roche.
- M. Pracovní proces musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od preamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Materiály a vybavení se musejí přiřadit jednotlivým preamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorách je nutné nosit rukavice, které se před opuštěním prostoru vymění. Vybavení a materiály pro přípravu činidla se nesmějí používat k přípravě vzorků, ani pro pipetování nebo zpracování amplifikované DNA či jiných zdrojů cílové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.
- N. Manipulace se vzorky a kontrolami se musí řídit pravidly pro zacházení s infekčním materiálem. Musí být používány bezpečné laboratorní postupy, např. postupy uvedené v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>12</sup> a v dokumentu CLSI č. M29-A3<sup>13</sup>. Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,5% chlornanu sodného v deionizované či destilované vodě.

**POZN.: Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25%. Ředěním domácího bělicího roztoku 1:10 dostaneme 0,5% roztok chlornanu sodného.**

- O. U vzorků přepravovaných v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.), musí být odběrové tampony ponechány v transportních zkumavkách, aby bylo možno provést vizuální důkaz inokulace vzorku. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byl hodnocen za použití vzorků přepravených v transportní zkumavce s odběrným tamponem a médiem M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.). Vzorky přepravené v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) bez tamponů hodnoceny nebyly a pro tento test se nedoporučují.
- P. Skladování vzorků moči za pokojové teploty (15-30 °C) po dobu delší než 24 hodin může vést k jejich degradaci. Vzorky moči uchovávané při pokojové teplotě (15-30 °C) déle než 24 hodin nesmí být pro testování použity.
- Q. **CT/NG URINE WASH, CT/NG LYS, CT/NG DIL, CT MMX, v2.0; CT Mn<sup>2+</sup>, CT IC, CT (+) C, v2.0 a CT (-) C, v2.0** obsahují azid sodný. Azid sodný může reagovat s olověnými nebo měděnými armaturami a vytvářet vysoce explozivní kovové azidy. Budete-li tedy vylévat roztoky obsahující azid do laboratorní výlevky, spláchněte je velkým objemem vody, aby se azid nemohl nikde usadit.
- R. Vzorek i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohl vystříknout a nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků. **Nepoužívejte zkumavky s nasazovacím uzávěrem.**
- S. Při práci s jakýmkoli činidlem používejte rukavice na jedno použití, pracovní oděv a ochranné brýle. Dbejte na to, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud by byla tato opatření zanedbána, může dojít k popáleninám. Jestliže se některá činidla rozlijí nebo rozsypou, rozřeďte je vodou a dosucha vytřete.

## ZACHÁZENÍ SE VZORKY A JEJICH SKLADOVÁNÍ

### *Činidla ani kontroly nezmrazujte.*

- A. **CT/NG LYS** uchovávejte za teplot 2-25 °C. **CT/NG URINE WASH** a **CT/NG DIL** uchovávejte při teplotě 2-8 °C. Vytvoří-li se v některém z těchto činidel během skladování sraženina, zahřejte je před použitím na pokojovou teplotu (15-30 °C) a důkladně promíchejte. Tato činidla jsou stabilní do vyznačeného data expirace.
- B. Skladujte **CT MMX, v2.0; CT Mn<sup>2+</sup>, CT (+) C, v2.0; CT (-) C, v2.0** a **CT IC** při teplotě 2-8 °C. Tato činidla jsou stabilní do uvedeného data použitelnosti.
- C. Částečně spotřebované kontroly uchovávejte mezi jednotlivými měřeními při teplotě 2-8°C. Před použitím zkontrolujte datum použitelnosti otevřených kontrol. **CT (+) C, v2.0** a **CT (-) C, v2.0** mohou být použity pro přípravu pracovních kontrol CT (+), v2.0 a CT (-), v2.0 až třikrát.
- D. **CT MMX, v2.0; CT Mn<sup>2+</sup>** a **CT IC** se dodávají v jednorázových lékovkách pro 16 reakcí. Jakýkoli nepoužitý materiál v těchto lékovkách musí být vyřazen.
- E. Pracovní Master Mix (připravený přidáním **CT Mn<sup>2+</sup>** a **CT IC** do **CT MMX, v2.0**) může být uchováván v temnu při pokojové teplotě (15-30 °C) ne déle než 2 hodiny nebo při 2-8 °C ne déle než 16 hodin. Připravené vzorky a kontroly se musí přidat do 2 hodin od přípravy pracovního Master Mix provedené při pokojové teplotě (15-30 °C) nebo do 16 hodin od přípravy pracovního Master Mix provedení při 2-8 °C.
- F. Zpracované vzorky jsou stabilní až 2 hodiny při 15-30 °C a 7 dní při 2-8 °C.
- G. S amplifikací je třeba začít do 90 minut od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do pracovního Master Mix.

## DODÁVANÝ MATERIÁL

### Činidla pro přípravu vzorků

- A. **AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit**  
 Souprava pro přípravu vzorku AMPLICOR® CT/NG  
 (P/N: 20759414 122; ART: 07 5941 4; US: 83315)

CT/NG PREP
------------

#### **CT/NG LYS**

(Lytické činidlo CT/NG)

#### **CT/NG URINE WASH**

(Promývací pufr na moč CT/NG)

#### **CT/NG DIL**

(Ředidlo na vzorky CT/NG)

## Amplifikační a detekční činidla

### B. COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0

CTM CT v2.0

(P/N: 05055202 190)

#### CT IC

(Vnitřní kontrola CT)

#### CT (+) C, v2.0

[Kontrola *C. trachomatis* (+), v2.0]

#### CT (-) C, v2.0

[Kontrola *C. trachomatis* (-), v2.0]

#### CT MMX, v2.0

(COBAS® TaqMan® CT Master Mix, v2.0)

#### CT Mn<sup>2+</sup>

(COBAS® TaqMan® CT roztok manganu)

## POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

### Vybavení a software

- Analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- Software AMPLILINK, verze 3.3
- Datová stanice pro software AMPLILINK
- Uživatelská příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka pro software AMPLILINK verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením **cobas p 630**
- Víčkovač K-zkumavek
- K-nosič pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- Nosič K-zásobníku pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48

### Odběr vzorků a transport

- Micro Test M4RT® BL KIT Ref. 12620 vyrobený a distribuovaný společností Remel, Inc. Tento produkt je také k dispozici přes objednávací systém Roche (P/N: 04863607190).
- Polypropylenové kelímky bez konzervačních látek na odběr moči

### Spotřební materiál

- K-zkumavky
- K-zásobníky pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48

## DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Pipeta Eppendorf® Repeater® se zásobníkem Eppendorf Combitip® pro objem 1,25 ml (sterilní, jednotlivě balený)
- Vířivý mixér
- Pipetovací pomůcka: Drummond (P/N: 4-000-100) nebo ekvivalentní
- 2,0 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacími víčky, sterilní, nesilikonizované (Sarstedt 72.693.105 nebo ekvivalentní)\*\*
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- Pipetory (pro objemy 50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 500 µl a 1 000 µl)\* s hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M, nebo její ekvivalent
- Prodloužené hroty s aerosolovou bariérou (Matrix 7055 nebo ekvivalentní) pro použití se vzorky přepravované v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) (Souprava MicroTest M4RT® BL)
- 37 °C ± 2 °C termoblok

- Absorpční papír
- Rukavice na jedno použití, bez pudru

\* Pipetory musí být přesné s 3% objemovou chybou. Kde je tak uvedeno, musí být použity hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem prosté DNázy (nebo bez nukleázy), aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

\*\* Na vzorek a kontrolní preparát se používají zkumavky se šroubovacím uzávěrem, aby se předešlo vystříknutí a případné vzájemné kontaminaci vzorků a kontrol. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**

## ODBĚR VZORKŮ, JEJICH TRANSPORT A UCHOVÁVÁNÍ

**POZN.: Zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.**

Testovat lze pouze:

1. Vzorky moči (mužské i ženské) přepravované v čistých polypropylenových nádobkách. **Vzorky moči odebrané do nádobek s konzervační přísadou se používat nesmějí.**
2. Vzorky endocervikálního výtěru na tamponu odebrané a transportované v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.).

K získání spolehlivých výsledků je třeba se řídit pokyny pro správný odběr vzorků uvedenými níže. Není tedy určen pro žádné jiné typy vzorků, jako jsou výtěry krční nebo rektální.

Aby se zajistilo, že bude laboratoř testovat vzorky vysoce kvalitní, je třeba vzorky moči a endocervikální výtěry do laboratoře doručit v co nejkratší době. Dbejte, aby se vzorky přepravovaly vždy za podmínek teplotní kontroly.

### A. Odběr vzorků

#### Vzorky moči (muži a ženy)

**POZN.: Pacient nesmí během předcházejících 2 hodin močit.**

1. Do polypropylenové nádoby neobsahující žádnou konzervační přísadu se odebere 10 až 50 ml první zachycené moči (první části toku).
2. Nádobku se vzorkem těsně uzavřete a patřičně označte. Při odběru a transportu použijte zavedené postupy laboratoře. Vzorek se může na testovací pracoviště přepravit za pokojové teploty (15-30°C).

#### Vzorky výtěru na tamponu (ženské) odebrané v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.)

1. Vzorky endocervikálního výtěru na tamponu odebrané a transportované v 3 ml média M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.). K odběru cylindrických nebo skvamo-cylindrických buněk po odstranění cervikálního hlenu používejte doporučené metody<sup>14</sup>.
2. Používejte pouze tampony dakronové, viskózní nebo s kalciumalginátovou špičkou s plastovou nebo nehliníkovou tyčinkou. Tampony s dřevěnými ani hliníkovými tyčinkami nepoužívejte.
3. Výtěrové tampony ponechte v transportním médiu. Nádobku se vzorkem těsně uzavřete a patřičně označte. Při odběru a transportu použijte zavedené postupy laboratoře. Vzorek se může na testovací pracoviště přepravit za pokojové teploty (15-30°C).

### B. Přeprava vzorků

#### Vzorky moči (muži a ženy)

1. Vzorky moči se mohou na testovací pracoviště přepravovat při teplotě 15-30 °C. Při teplotě 15-30 °C jsou stálé 24 hodin.
2. Vzorky moči, které je třeba odeslat do vzdáleného testovacího střediska, se musí zaslat nepřetržitou dopravní službou se zaručeným předáním do 24 hodin; teplota zásilky pak může být 15-30°C. Jestliže se budou vzorky moči přepravovat při teplotě 15-30°C, je třeba je až do přepravy skladovat při teplotě 2-8°C, aby se zajistilo, že při teplotě 15-30°C nebudou uchovávány déle než 24 hodin. Při jejich přepravě musí být splněny podmínky všech platných místních i celostátních předpisů pro dopravu etiologických látek<sup>15</sup>.

#### Vzorky výtěru na tamponu (ženské) odebrané v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.)

1. Za předpokladu, že celková doba skladování a přepravy při teplotě 15-30°C nepřekročí 14 dní, je možno výtěry přepravit na testovací pracoviště při teplotě 15-30°C. Pokud je doprava zpožděna tak, že by se vzorky do laboratoře dostaly po době delší než 14 dní od odběru, je třeba výtěry zmrazit. Jsou-li použity pro kultivaci, mělo by se s vzorky manipulovat dle doporučení pro kultury (-60°C pokud není kultivace uskutečněna do 24 hodin).
2. Výtěry, které se přepravují na vzdálené pracoviště, je třeba odeslat při teplotě 15-30°C po odběru v souladu s postupy dané laboratoře pro dopravu vzorků výtěrů. Při jejich přepravě musí být splněny podmínky všech platných místních i celostátních předpisů pro dopravu etiologických látek<sup>15</sup>.

## C. Uchovávání vzorků

**POZN.: Rutinní zmrazování nebo delší skladování může mít vliv na funkci testu.**

### Vzorky moči (muži a ženy)

Vzorky moči, které se nezpracují do 24 hodin od odběru, musí být uchovávány při teplotě 2-8 °C a zpracovány do 7 dnů od odběru. Pokud je do 7 dnů od odběru zpracovat nelze, je možno je skladovat až 30 dnů při teplotě -20°C nebo nižší.

### Vzorky výtěru na tamponu (ženské) odebrané v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.)

Výtěry, které se ve zkušební laboratoři netestují hned při příjmu, se uchovávají při teplotě 15-30 °C a je nutno je zpracovat do 14 dnů od odběru. Pokud vzorky do 14 dnů od odběru zpracovat nelze, musí se uložit při teplotě -20 °C nebo nižší a zpracovat do 30 dnů od odběru.

## NÁVOD K POUŽITÍ

**POZN.: Podrobné provozní pokyny, tisk výsledků a interpretace příznaků, poznámek a hlášení o chybách naleznete v Příručce k přístroji pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s provozní příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.3 a v Provozní příručce softwaru AMPLILINK, verze 3.3 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48, analyzátořem COBAS® AMPLICOR® a zařízením cobas p 630.**

**POZN.: Všechna amplifikační a detekční činidla musí být před použitím při pokojové teplotě (15-30 °C). Vyjměte z teploty 2-8 °C minimálně 30 minut před použitím.**

**POZN.: Vzorky výtěrů a moči musí být před použitím vyrovnány po dobu 15 - 30 minut na pokojovou teplotu (15-30 °C).**

**POZN.: Kde je tak uvedeno, používají se pipetory s hroty s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posunem. Věnujte maximální pozornost zabránění kontaminace.**

### Množství pro jeden cyklus:

Každá souprava testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 obsahuje dostatečné množství činidla na tři 16-testová měření, která mohou probíhat zvlášť nebo současně. Minimálně jeden replikát, každý z **CT (-) C, v2.0** a **CT (+) C, v2.0**, musí být zahrnut do každého cyklu testu s až 22 vzorky naplněnými na K-nosiči (viz část „Kontrola kvality“). Amplifikační a detekční činidla jsou balena v lahvičkách na jedno použití pro 16 testů. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobkem 16. Činidla pro přípravu vzorků jsou balena jednotlivě v lahvičkách pro 100 testů.

### Příprava vzorku a kontroly

#### A. Příprava vzorků prováděná v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků

##### Vzorky moči (muži a ženy)

1. Pro každý vzorek od pacienta označte jednu 2,0 ml zkumavku se šroubovacím uzávěrem.
2. Do každé takto označené zkumavky odměřte 500 µl **CT/NG URINE WASH**.
3. Moč vířením po dobu 3-10 sekund důkladně promíchejte. Používáte-li vzorky zmrazené, nechte je před mícháním nejprve při pokojové teplotě (15-30 °C) roztát (**objemy větší než 2 ml je třeba nechat roztát při teplotě 2-8 °C přes noc**); se zpracováváním pokračujte, i když pozorujete sraženinu. Z nádobek se vzorky moči sejměte opatrně uzávěry. Dejte pozor, abyste si močí v uzávěru nepotřísnili rukavice. Pokud k tomu přesto dojde, rukavice si před prací s dalším vzorkem vyměňte za čisté.
4. Do značených zkumavek obsahujících **CT/NG URINE WASH** odměřte po 500 µl dobře promísené moči pacienta. Na každý vzorek přitom použijte nový hrot s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
5. Inkubujte zkumavky 15 minut při teplotě 37°C.
6. Odstřeďte po dobu 5 minut při  $\geq 12\ 500 \times g$ .
7. Vylijte supernatant a každou zkumavku blotujte na zvláštní list savého papíru.
8. Do každé zkumavky odměřte 250 µl **CT/NG LYS**; použijte přitom pokaždé nový hrot pipety s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
9. Inkubujte zkumavky po dobu 15 minut při pokojové teplotě (15-30°C).

10. Do každé zkumavky odměřte 250 µl **CT/NG DIL**; použijte přitom pokaždé nový hrot pipety s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
11. Centrifugujte zkumavky 10 minut při  $\geq 12\ 500 \times g$ .
12. Zpracované vzorky je možno před odpipetováním alikvotních podílů do K-zkumavek nebo K-zásobníků obsahujících pracovní Master Mix uchovávat při pokojové teplotě (15-30 °C) po dobu až 2 hodin. Skladujte zpracované vzorky při teplotě 2-8 °C nebudou-li alikvotní podíly přidány do K-zkumavek nebo K-zásobníků do 2 hodin. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2-8°C musí být testovány během 7 dnů.

#### Vzorky výtěrů

**POZN.: Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byl hodnocen pomocí média M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.). Pokud by laboratoř chtěla používat jiné transportní médium, musí si vyhodnocení provést sama.**

1. **Zkontrolujte, zda zkumavka s kultivačním transportním médiem M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) obsahuje tampon.** Výtěrové tampony by se měly ponechat ve zkumavce s médiem M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.), aby se zabránilo nesprávné manipulaci. Přítomnost tamponu v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) nezaručuje adekvátní odběr vzorku.
2. Pro každý vzorek od pacienta označte jednu 2,0 ml zkumavku se šroubovacím uzávěrem. **Nepoužívejte zkumavky s nasazovacím uzávěrem.**
3. Do označených 2 ml polypropylenových zkumavek odměřte po 100 µl **CT/NG LYS**.
4. Vzorky vířením promíchejte. Pokud byly uchovávané ve zmrazeném stavu, nechte je nejprve za pokojové teploty (15-30 °C) roztát. Ze zkumavek se vzorky sejměte opatrně uzávěr. Dávejte přitom pozor, abyste si nepotřísnili rukavice. Pokud k tomu přesto dojde, rukavice si před prací s dalším vzorkem vyměňte za čisté.
5. Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou přidejte 100 µl dobře promíchaného vzorku do zkumavky s obsahem **CT/NG LYS**. Na každý vzorek přitom použijte nový hrot s aerosolovou bariérou. Zkumavku uzavřete a dobře vířením promíchejte.
6. Inkubujte zkumavky po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15-30 °C).
7. Do každé zkumavky odměřte 200 µl **CT/NG DIL**; použijte přitom pokaždé nový hrot pipety s aerosolovou bariérou. Zkumavku uzavřete a dobře vířením promíchejte.
8. Inkubujte zkumavky po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15-30 °C).
9. Zpracované vzorky je možno před odpipetováním alikvotních podílů do K-zkumavek nebo K-zásobníků obsahujících pracovní Master Mix uchovávat při pokojové teplotě (15-30 °C) po dobu až 2 hodin. Skladujte zpracované vzorky při teplotě 2-8 °C nebudou-li alikvotní podíly přidány do K-zkumavek nebo K-zásobníků do 2 hodin. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2-8°C musí být testovány během 7 dnů.

#### B. Příprava kontrol prováděná v: Preamplifikace – prostor pro přípravu vzorků

**POZN.: Pracovní kontroly musí být připravovány každý den čerstvé. Na jeden den je možno si pro přípravu řady zpracovaných kontrol připravit po jedné pracovní kontrole, koncem dne se však musí zlikvidovat.**

**POZN.: Činidla CT (+) C, v2.0 a CT (-) C, v2.0, která jsou součástí soupravy testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0, jsou určena pro použití k přípravě CT (+), v2.0 a CT (-), v2.0 pracovních kontrol až třikrát.**

**POZN.: Pokud se testují jak výtěry, tak vzorky moči, je třeba pro každý typ vzorku připravit samostatnou sadu kontrol. Vzhledem k tomu, že jsou kontroly připravovány pro každý typ vzorku, doporučuje se oddělit typy vzorků mezi jednotlivými K-nosiči. Každá sada kontrol pro určitý typ vzorku bude poté použita k ověření stanoveného typu vzorku.**

#### Pracovní kontroly: Připravte následující pracovní kontroly CT (+), v2.0 a CT (-), v2.0.

1. Pomocí pipetoru se sterilním pipetovým hrotem odměřte do dvou 2 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 1 ml **CT/NG DIL**. Jednu zkumavku označte „Pracovní kontrola CT (+), v2.0“, druhou „Pracovní kontrola CT (-), v2.0“.
2. **CT (+) C, v2.0 a CT (-) C, v2.0** vířením po dobu 5 sekund při maximální rychlosti promíchejte. Ze zkumavek opatrně sejměte uzávěry. Dávejte přitom pozor, abyste si nepotřísnili rukavice. Pokud k tomu přesto dojde, rukavice si před prací s dalším vzorkem vyměňte za čisté.
3. Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené jako „Pracovní kontrola CT (+), v2.0“ 100 µl **CT (+) C, v2.0**. Víčko uzavřete a uložte zkumavku **CT (+) C, v2.0** do prostředí s teplotou 2-8 °C.

- Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené jako „Pracovní kontrola CT (-), v2.0“ 100 µl **CT (-) C, v2.0**. Víčko uzavřete a uložte zkumavku **CT (-) C, v2.0** do prostředí s teplotou 2-8 °C.
- Zkumavky s Pracovní kontrolou uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Uchovávejte při pokojové teplotě (15-30 °C) a koncem pracovního dne je zlikvidujte.

**Vzorky moči: Připravte následující zpracované kontroly CT (+), v2.0 a CT (-), v2.0.**

- Pomocí pipetoru se sterilním pipetovým hrotem odměřte do dvou 2 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 250 µl **CT/NG LYS**. Jednu zkumavku označte „Zpracovaná kontrola CT (+), v2.0“ a druhou „Zpracovaná kontrola CT (-), v2.0“.
- Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola CT (+), v2.0“ 250 µl pracovní kontroly CT (+), v2.0.
- Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola CT (-), v2.0“ 250 µl pracovní kontroly CT (-), v2.0.
- Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Inkubujte po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15-30 °C). Uchovávejte při pokojové teplotě (15-30 °C) a koncem pracovního dne je zlikvidujte.

**Výtěry: Připravte následující zpracované kontroly CT (+), v2.0 a CT (-), v2.0.**

- Pomocí pipetoru se sterilním pipetovým hrotem odměřte do dvou 2 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 100 µl **CT/NG LYS**. Jednu zkumavku označte „Zpracovaná kontrola CT (+), v2.0“ a druhou „Zpracovaná kontrola CT (-), v2.0“.
- Do každé ze zkumavek obsahujících **CT/NG LYS** odměřte pomocí pipetoru se sterilním pipetovým hrotem po 100 µl média M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.).
- Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
- Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola CT (+), v2.0“ 200 µl pracovní kontroly CT (+), v2.0.
- Pomocí pipetoru s novým hrotem s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola CT (-), v2.0“ 200 µl pracovní kontroly CT (-), v2.0.
- Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Inkubujte po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15-30 °C). Uchovávejte při pokojové teplotě (15-30 °C) a koncem pracovního dne je zlikvidujte.

**Amplifikace a detekce**

**POZN.: K-nosiče a držák K-nosiče by měly být otřeny tkaninou nepouštějící vlas navlhčenou do 70% roztoku isopropanolu.**

**A. Příprava činidel**

**POZN.: Vzorky a kontroly zpracované pomocí činidel COBAS® TaqMan® CT Master Mix, v2.0 (CT MMX, v2.0); „Pracovní Master Mix“ (Pracovní MMX) a Pracovní MMX plus jsou citlivé na světlo. Ochraňujte tato činidla před světlem.**

**POZN.: Master Mix COBAS® TaqMan® CT, v2.0 (CT MMX, v2.0); roztok manganu COBAS® TaqMan® CT (CT Mn<sup>2+</sup>) a vnitřní kontrola COBAS® TaqMan® CT (CT IC) musí být temperovány při pokojové teplotě (15-30 °C) po dobu alespoň 30 minut před přípravou pracovního Master Mixu.**

**POZN.: Po dokončení přípravy vzorku a kontroly připravte pracovní MMX.**

**POZN.: Pracovní MMX musí být použit do 2 hodin od přípravy, pokud je uchováván při pokojové teplotě (15-30 °C) nebo do 16 hodin, pokud je uchováván při teplotě 2-8 °C.**

**POZN.: Jakmile jsou zpracované vzorky a kontroly přidány do pracovního MMX, musí být amplifikace započata do 90 minut.**

- Vyrovnejte teplotu jedné lékovky **CT MMX, v2.0**, jedné lékovky **CT IC** a jedné lékovky **CT Mn<sup>2+</sup>** při pokojové teplotě (15-30 °C) po dobu alespoň 30 minut.
- Umístěte K-nosič do držáku K-nosiče. Umístěte nové K-zkumavky nebo K-zásobník do K-nosiče, aniž byste se dotkli stran K-zkumavky nebo jamek K-zásobníku.

**POZN.: Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru.**

- Pokud je to nutné, otevřete K-zkumavky pomocí víčkovače K-zkumavek. Umístěte víčka do parkovací pozice držáku K-zkumavek.

- Připravte pracovní MMX dle následujícího návodu:

Pro 16 testů, přidejte 150 µl **CT Mn<sup>2+</sup>** a 50 µl **CT IC** do jedné lahvičky **CT MMX, v2.0**. Lahvičku zavřete a dobře promíchejte převrácením 10x. **Víření k promísení pracovního MMX nepoužívejte.** Chraňte pracovní MMX před světlem a použijte do 2 hodin od přípravy, pokud je uchováván při pokojové teplotě (15-30 °C) nebo do 16 hodin, pokud je uchováván při teplotě 2-8 °C.

5. Odpipetujte 50 µl pracovního MMX do každé K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku.

**POZN.: Byly-li zpracované vzorky skladovány ve zmrazeném stavu před amplifikací, rozmrazte je při pokojové teplotě (15-30 °C) a důkladně promíchejte vířením. Po tomto promíchání se zpracované vzorky centrifugují 10 minut při  $\geq 12,500 \times g$ .**

**POZN.: Při výdeji pracovního MMX se nedotýkejte špičkou pipety žádného jiného povrchu než příslušné K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku. Pokud dojde k jakémukoliv kontaktu s povrchem nosiče K-zásobníku, musí být špička zlikvidována, aby se zabránilo zavlečení PCR inhibitorů.**

6. Z každého zpracovaného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku obsahující pracovní MMX; použijte k tomu mikropipetor s hrotem s aerosolovou bariérou nebo s pozitivním posuvem. Jemně promíchejte každý vzorek nebo kontrolu nahoru a dolů třikrát pomocí mikropipetoru, který nevytváří bubliny.

**POZN.: Při výdeji zpracovaných vzorků a kontrol se nedotýkejte špičkou pipety žádného jiného povrchu než příslušné K-zkumavky nebo jamky K-zásobníku. Pokud dojde k jakémukoliv kontaktu s povrchem nosiče K-zásobníku, musí být špička zlikvidována, aby se zabránilo zavlečení PCR inhibitorů.**

7. Opakujte krok 6 pro každý zpracovaný vzorek a kontrolu, dokud nebylo vše přeneseno do K-zkumavek nebo K-zásobníků. Pro každý vzorek a kontrolu použijte novou špičku. Proveďte vizuální kontrolu přítomnosti bublinek a dle potřeby je odstraňte. Zakryjte K-zásobník nebo uzavřete K-zkumavky pomocí víčkovače K-zkumavek. Vizuálně si ověřte, že byly přidány odpovídající objemy.
8. S amplifikací je třeba začít do 90 minut od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do K-zkumavek nebo jamek K-zásobníku obsahujících pracovní MMX.
9. Zbytky jednotlivých zpracovaných vzorků uchovejte při teplotě 2-8 °C pro případ, že by bylo třeba test opakovat. Vzorek je k opakovanému testu použitelný do 7 dnů od přípravy.

## **B. Plnění a provoz analyzátoru COBAS® TaqMan® 48**

1. Zapněte počítač pracovní stanice a přihlaste se k Windows XP za použití odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
2. Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® 48. Ověřte, zda se přístroj inicializuje a je připraven pro použití. Jsou-li K-nosiče z předchozích měření nadále umístěny v některém z termocyklerů, odstraňte je pomocí přemístovače K-nosičů.
3. Spusťte software AMPLILINK na počítači. Přihlaste se pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
4. Pro vytvoření příkazů K-nosiče pro analyzované vzorky klikněte na ikonu **Orders**. Vyberte tlačítko **Sample**, pak klikněte na tlačítko **New** a zadejte číslo příkazu pro každý vzorek pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Zvolte soubor definice testu pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0. Zopakujte pro každý vzorek. Klepněte myší na tlačítko **Save**.

**POZN.: Má-li být zpracováno méně než 24 zkumavek, musí být obsazeny pozice 1, 2, 5, 20, 23 a 24 pro vyvážení K-nosiče v termocykleru.**

5. Zadejte informace o kontrole kvality výběrem tlačítka **Quality Control** v okně **Orders**. Klepněte na tlačítko **New** a zadejte informace pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0, dodaný spolu se soupravou, pomocí klávesnice nebo čtečky čárového kódu. Zadejte číslo šarže testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a datum expirace. Klikněte na „OK“.
6. Přiřadte číslo K-nosiče k danému měření kliknutím na tlačítko **K-Carrier** v okně **Orders**. V okně **K-Carrier** klikněte na **New**. V buňce vpravo od **“K-Carrier ID”** zadejte číslo K-nosiče z čárového kódu na K-nosiči pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Všimněte si, že výsledky z předchozího měření se stejným ID K-nosiče musí být akceptovány. Poté, co bylo stejné číslo čárového kódu K-nosiče použito dvakrát na stejném analyzátoru, musí být výsledky z těchto šarží akceptovány, archivovány a vyčištěny před novým použitím stejného čísla čárového kódu. Zvolte definici testu pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 z panelu testů v dolní části okna.
7. V seznamu **Worklist** vyberte první řadu ve sloupci Type (T). Označte toto pole, abyste se dostali do rozbalovací nabídky a pak vyberte požadovaný typ kontroly. Pak poklepejte na pole ID vzorku pro stejnou řadu. Zobrazí se okno **LookUp Control** se všemi dostupnými kontrolami. Jakmile je kontrola vybrána, odpovídající číslo šarže a datum expirace bude zobrazeno v pravém dolním informačním panelu. Opakujte tento proces pro všechny požadované kontroly.
8. Pro zadání vzorků do **Worklist** klikněte dvakrát na první pozici (řadu) pro zadání vzorku. Tím se zobrazí okno **Lookup Sample** obsahující přiřazené příkazy pro vzorek. Použijte klávesy **Shift + šipka** pro označení více než jednoho čísla příkazu. Ověřte, že ke všem objednávkám byly přiřazeny definice testu pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0.
9. Klikněte na **Save** pro uložení přiřazení příkazu K-nosiče.

### C. Amplifikace a detekce

1. Vyberte ikonu **Systems** v systémovém tlačítku a klikněte na **Open** pro otevření termocyklieru. Jakmile se kryt termocyklieru zcela otevře a objeví se nápis "**Ready to Load**" v okně **Systems**, zvedněte a přidrže víko termocyklieru otevřené. Pomocí přemísťovače K-nosiče přemístěte naplněný K-nosič obsahující uzavřené K-zkumavky nebo K-zásobník s pracovním Master Mixem, vzorky a kontrolami do termocyklieru. Zavřete víko termocyklieru.
2. Klikněte na **Start** v okně **Systems** pod ikonou TC pro uzavření krytu termocyklieru a spusťte běh analýzy.
3. Amplifikaci a detekci provádí analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky.

### VÝSLEDKY (softwaru AMPLILINK, verze 3.3)

#### Kalkulace výsledku

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje, zda je ve vzorcích nebo kontrolách detekována CT DNA.

#### Analyzátor COBAS® TaqMan® 48:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro CT DNA a vnitřní kontroly pro CT DNA.
- Stanovuje, zda je CT DNA detekována na základě Ct hodnot pro CT DNA nebo vnitřní kontrolu pro CT DNA.

#### Validace cyklu pro software AMPLILINK, verze 3.3

Zkontrolujte výsledkové okno softwaru AMPLILINK v3.3 nebo výtisk na přítomnost příznaků a komentářů, abyste se ujistili, že je cyklus měření platný.

Cyklus je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® CT, v2.0. Platný cyklus má následující výsledky:

Kontrola	Výsledek	Interpretace
Negativní kontrola	NC Negative	Kontrola v rozsahu testu
Pozitivní kontrola	PC Positive	Kontrola v rozsahu testu

Test není platný, pokud se u kontrol testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 objeví některé z následujících příznaků:

#### CT Negativní kontrola, v2.0:

Příznak	Výsledek	Interpretace
NC_INVALID	Invalid	Kontrola je pozitivní, žádný signál vnitřní kontroly nebo signál vnitřní kontroly mimo rozsah

#### CT Pozitivní kontrola, v2.0:

Příznak	Výsledek	Interpretace
PC_INVALID	Invalid	Kontrola je negativní nebo není v rozsahu, žádný signál vnitřní kontroly nebo signál vnitřní kontroly mimo rozsah

Pokud je cyklus neplatný, zopakujte ho celý, včetně přípravy vzorku a kontroly, amplifikace a detekce.

#### Interpretace výsledků:

Pro platný běh zkontrolujte každý jednotlivý vzorek na přítomnost příznaků nebo komentářů ve výtisku výsledku. Výsledky se interpretují takto:

**POZN.:** Platný cyklus měření může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky resp. poznámky nebo ne.

Výsledky vzorků jsou interpretovány následujícím způsobem:

Příznak	Výsledek	Interpretace
Žádný příznak	CT Not Detected	<b>DNA <i>C. trachomatis</i> nedetekována.</b> Vzorek je považován za negativní pro <i>C. trachomatis</i> . Negativní výsledek ovšem infekci bakterií <i>C. trachomatis</i> nevylučuje, protože správný výsledek je odvislý od správného odběru vzorku, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečného množství DNA pro detekci.
Žádný příznak	CT Detected	<b>DNA <i>C. trachomatis</i> detekována.</b> Vzorek je pozitivní na <i>C. trachomatis</i> .
CNTRL_FAIL	INVALID	<b>Neplatná kontrola(y).</b> Zpracujte další alikvotní podíl původního vzorku a test opakujte.
S_INVALID	Invalid	<b>Inhibitorní vzorek.</b> <i>C. trachomatis</i> DNA není detekovaná, i když může být přítomna. Zpracujte další podíl původního vzorku a test zopakujte. Pokud již není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový.

## KONTROLA KVALITY

Minimálně jeden replikát každé kontroly COBAS® TaqMan® CT (–), v2.0 a kontroly COBAS® TaqMan® CT (+), v2.0 musí být zahrnut do každého K-nosiče. Jak je tomu při každém novém laboratorním postupu, noví pracovníci obsluhy by měli zvážit, jestli by nebylo dobře při každém testování použít ještě další kontroly až do doby, než dokáží test provádět s vysokou jistotou správně. Neexistují požadavky týkající se pozice kontrol na K-nosiči. Zkontrolujte, zda výtisk cyklu neobsahuje příznaky a poznámky, abyste se přesvědčili, že byl cyklus platný.

### Negativní kontrola

**CT (–) C, v2.0** musí vykázat výsledek „**NC Negative**“, jinak bude celý cyklus neplatný. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li kontrola **CT (–) C, v2.0** trvale neplatná, kontaktujte místní pobočku Roche a požádejte o technickou pomoc.

### Pozitivní kontrola

Výsledek kontroly **CT (+) C, v2.0** musí být „**PC Positive**“, jinak bude celý cyklus neplatný. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Je-li **CT (+) C, v2.0** trvale mimo přiřazené rozmezí, kontaktujte vaši místní pobočku Roche pro technickou pomoc.

Kontrola CT (+), v2.0 obsahuje přibližně 20 kopií/test sekvenční DNA plazmidu *C. trachomatis*. To je zhruba čtyřnásobek minimální detekční úrovně tohoto testu zjištěné Poissonovou analýzou. Amplifikace a detekce kontroly CT (+), v2.0 jsou zárukou, že amplifikace proběhla. Kontrola CT (+), v2.0 neslouží ani ke sledování účinnosti amplifikace, ani k ověřování detekční úrovně testu.

### Vnitřní kontrola

Vnitřní kontrola je určena pro identifikaci vzorků, které obsahují inhibitory polymerázy. Použití vnitřní kontroly eliminuje všechny falešně negativní výsledky testu.

## BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI PRÁCI

Tak jako při každém testovacím postupu, je pro správné provedení tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické senzitivitě tohoto testu je třeba věnovat mimořádnou péči zachování čistoty činidel soupravy či amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je podezření na kontaminaci, je třeba činidlo zlikvidovat.

## OMEZENÍ

1. Testujte pouze indikované typy vzorků. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byl hodnocen pomocí ženských endocervikálních výtěrů (tamponů) odebraných v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a ženské a mužské moči odebrané bez konzervačních látek. Testování jiných typů vzorků nebylo hodnoceno; není vyloučeno, že by poskytlo výsledky falešně negativní nebo falešně pozitivní.
2. Detekce *C. trachomatis* závisí na počtu organismů ve vzorku a vliv na ni může mít způsob odběru vzorku, pacientovy faktory, jako je věk, anamnéza sexuálně přenosných nemocí nebo výskyt symptomů, stádium infekce, popřípadě infikující kmen *C. trachomatis*.
3. V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní. K testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byla zařazena vnitřní kontrola CT, umožňující identifikaci zpracovaných vzorků obsahujících substance, které mohou interferovat s PCR amplifikací o více než 20 kopiích/test.
4. Na test může mít vliv i prevalence chlamydiální infekce v dané populaci. Při testování populace s nízkou prevalencí nebo osob bez rizika infekce pozitivní prediktivní hodnoty klesají. Protože prevalence *C. trachomatis* může být u některých skupin obyvatel nebo skupiny pacientů nízká, může jejich falešně-pozitivní míra 4% až 5% převýšit správně-pozitivní míru a prediktivní hodnota pozitivního testu je velmi nízká. Jelikož někteří skutečně infikovaní pacienti nebudou při testování jednoho vzorku zjištěni, nemůže být z klinických dat zjištěn ani odhadnut správný podíl falešně-pozitivních případů. Podíl falešně-pozitivních výsledků testu může záviset na zkušenosti, zručnosti pracovníka, zacházení se vzorky i s činidly nebo podobných faktorech každé laboratoře.
5. Důvěryhodnost výsledků závisí na správném odběru vzorků, transportu, skladování a způsobu zpracování. Proměnné spojené se skladováním nejsou zcela definovány.
6. Přidání enzymu AmpErase k činidlu Master Mix umožňuje selektivní amplifikaci cílové DNA. Aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy, jež jsou v tomto příbalovém letáku uvedeny.
7. Testem nelze určit, zda bude terapie úspěšná nebo neúspěšná.
8. Jako je tomu i u ostatních diagnostických testů, je třeba výsledky testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 interpretovat s uvážením všech klinických zjištění a laboratorních nálezů.
9. Se soupravou by měli pracovat pouze pracovníci vyškolení v používání technik PCR.
10. Vhodnost vzorku (v případě výtěrů) je možno posoudit pouze mikroskopickou vizualizací cylindrických epitelových buněk ve vzorcích.
11. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 se nedoporučuje k hodnocení při podezření na sexuální zneužívání nebo při jiných medicínsko-právních indikacích.
12. Pokud by v jakékoliv situaci mohly falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky mít negativní zdravotní, sociální nebo psychologické dopady, doporučuje se provést další testování.
13. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 poskytuje kvalitativní výsledky. Mezi hodnotou ohybu pozitivního testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a počtem buněk *C. trachomatis* v infikovaném vzorku nelze hledat žádnou korelaci. Testem se detekuje pouze *C. trachomatis*, nikoli však *C. psittaci*, *C. pneumoniae* a *C. pecorum*.
14. Pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 s mužskou či ženskou močí se doporučuje zachytit první náhodný vzorek moči, čímž se míní prvních 10 až 50 ml proudu moči. Vlivy dalších proměnných, jako je první zachycená moč oproti moči ze středního proudu, po sprchování, apod., hodnoceny nebyly.
15. Rovněž nebyly hodnoceny vlivy dalších potenciálních proměnných, jako je vaginální výtok, používání tamponů, sprchování apod., a proměnných odběru vzorku.
16. Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 nemá nahrazovat cervikální vyšetření ani odběr endocervikálních vzorků k diagnostice urogenitální infekce. Pacienti mohou mít cervicitidu, uretritidu, infekci močových cest nebo vaginální infekci z jiných příčin nebo jako souběžnou infekci s jinými agens.
17. Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® TaqMan® 48.
18. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.

19. Mezi rušivé látky patří zejména:
- Přítomnost hlenu v cervikálních vzorcích může inhibovat PCR a vést k falešně negativním výsledkům. Pro optimální výkon testu se doporučují vzorky bez přítomnosti hlenu. Před odběrem vzorku se doporučuje odstranit cervikální sekret a výtok houbičkou nebo velkým tamponem<sup>16</sup>.
  - Vzorky obsahující více než 7% obj. krve mohou vést k falešně pozitivním výsledkům.
20. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech DNA kryptického plazmidu nebo chromozomální DNA *C. trachomatis* pokryté primery testu a/nebo sondou mohou vést k selhání detekce bakterie v této situaci.
21. Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli v jejich laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi.

## VYHODNOCENÍ LABORATORNÍCH VÝSLEDKŮ

### Analytická specifická:

Specifická testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byla vyhodnocena přidáním DNA z kultivovaných buněk, kultivovaných virů nebo plazmidových konstrukcí do činidel pro přípravu vzorku CT/NG a otestována testem COBAS® TaqMan® CT, v2.0. Testované organismy se hojně vyskytují v urogenitálním traktu. Reaktivitu v testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 nevykazoval žádný z následujících organismů ani virů:

<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Lactobacillus crispus</i>
<i>Acinetobacter sp. genospecies 3</i>	<i>Lactobacillus lactis lactis</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Lactobacillus oris</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Lactobacillus parabuchnerii</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>Bacteriodes fragilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Bacteriodes caccae</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Bifidobacillus longum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Neisseria elongata</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria gonorrhoea</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Chromobacter violaceum</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pasteurella maltocida</i>
<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Pediococcus acidilactica</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Prevotella bivia</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Derxia gummosa</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
Virus Epstein-Barrové	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia denitrificans</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

*Gardnerella vaginalis*  
*Gemella haemolysans*  
*Gemella morbillorum*  
*Haemophilus influenzae*  
*Haemophilus ducreyi*  
Herpes simplex virus typu 1  
Herpes simplex virus typu 2  
Lidský papilloma virus typ 16  
Lidský papilloma virus typ 18  
*Kingella kingae*  
*Klebsiella pneumoniae ss ozaenae*

*Staphylococcus epidermidis*  
*Streptococcus agalactiae*  
*Streptococcus anginosus*  
*Streptococcus bovis*  
*Streptococcus dysgalatia*  
*Streptococcus equinus*  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Streptococcus pyogenes*  
*Streptococcus salivarius*  
*Treponema pallidum*  
*Vibrio parahaemolyticus*  
*Yersinia enterocolitica*

#### **Analytická senzitivita: Purifikovaná DNA**

Při stanovení analytické specificity pro purifikovanou DNA demonstroval test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 schopnost reprodukovatelně detekovat ( $\geq 95\%$  pozitivních výsledků) 5 nebo více kopií purifikované DNA *C. trachomatis* na PCR reakci. Počet kopií DNA *C. trachomatis* použitých v experimentu byl stanoven Poissonovou analýzou.

#### **Mez detekce: Nevariantní buňky *C. trachomatis***

Mez detekce testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byla stanovena analýzou ředění kultivovaných buněk *C. trachomatis* v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a normální lidské moči. Šest členů panelu bylo analyzováno pro každý typ matrix. Celkově 144 replikátů na koncentraci bylo analyzováno pro každý typ matrix. Negativní hladiny byly analyzovány s replikátem o velikosti 72.

Výsledky z této studie v tabulce 1 ukazují, že pomocí analýzy Probit test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 detekoval *C. trachomatis* při předpokládaných koncentracích 2,1 IFU/ml pro médium M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) Media a moč s koncentrací 1,2 IFU/ml. Z důvodu variability počtu zahrnovaných těles nalezených v kultuře *C. trachomatis* nemá počet živých organismů v *C. trachomatis* přímou souvislost s počtem amplifikovatelných cílů CT.

**Tabulka 1**  
**Detekční mez testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 s nevariantními buňkami *C. trachomatis***

Matrix	Hladina panelu (IFU/ml)	Hladina panelu (IFU/PCR)	Průměrná CT ohybu	Průměrná IC ohybu	Celkový počet platných N	Pozitivní detekce	% pozitivní
M4RT	8	0,1	37,7	36,3	144	144	100,0
M4RT	4	0,05	38,8	36,3	144	144	100,0
M4RT	2	0,025	40,2	36,2	144	132	91,7
M4RT	1	0,012	40,7	36,2	144	116	80,6
M4RT	0,5	0,006	40,9	36,2	144	73	50,7
M4RT	0	0	N/A	36,2	72	0	0,0
95% Probit hodnota: 2,1 IFU/ml 95% interval spolehlivosti: 1,8 – 2,7							
Matrix	Hladina panelu (IFU/ml)	Hladina panelu (IFU/PCR)	Průměrná CT ohybu	Průměrná IC ohybu	Celkový počet platných N	Pozitivní detekce	% pozitivní
Moè	20	1	34,6	36,1	144	144	100,0
Moè	4	0,2	37,8	36,2	144	143	99,3
Moè	2	0,1	38,6	36,1	144	144	100,0
Moè	0,5	0,025	40,3	35,9	143	110	76,9
Moè	0,25	0,0125	41,4	36,0	144	87	60,4
Moè	0	0	N/A	35,8	72	0	0,0
95% Probit hodnota: 1,2 IFU/ml 95% interval spolehlivosti: 0,9 – 1,7							

**Mez detekce: Buňky *C. trachomatis* nvCT (švédská varianta kmene)**

Mez detekce testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byla stanovena analýzou ředění kultivovaných buněk *C. trachomatis* nvCT v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a normální lidské moči. Šest hladin panelu bylo analyzováno pro každý typ matrix. Celkově 144 replikátů na koncentraci bylo analyzováno pro každý typ matrix. Negativní hladiny byly analyzovány replikátem o velikosti 72. Pro uzpůsobení konečného výsledků Probit byl použit 7 až 10krát korekční faktor za účelem kompenzace rozdílů v cílových kopiích mezi genem *ompA* (1 kopie na buňku) a kryptického plazmidu (7 až 10 kopii/buňku).

Výsledky z této studie v tabulce 2 ukazují, že pomocí analýzy Probit test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 detekoval *C. trachomatis* nvCT (švédská varianta kmene) při koncentracích 35,7 až 51,0 IFU/ml pro médium M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) Media (průměr 43,3 IFU/ml) a 14,7 až 21 IFU/ml pro moč (průměr 17,9 IFU/ml). Z důvodu variability počtu zahrnovaných těles nalezených v kultuře *C. trachomatis* nemá počet živých organismů přímou souvislost s počtem amplifikovatelných cílů CT.

**Tabulka 2**  
**Detekční mez testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0**  
**s buňkami C. trachomatis nvCT (švédská varianta kmene)**

Matrix	Hladina panelu (IFU/ml)	Hladina panelu (IFU/PCR)	Průměrná CT ohybu	Průměrná IC ohybu	Celkový počet platných N	Pozitivní detekce	% pozitivní
M4RT	8	0,1	38,4	36,3	144	141	97,9
M4RT	4	0,05	39,8	36,3	144	136	94,4
M4RT	1	0,125	40,1	36,2	144	86	59,7
M4RT	0,5	0,006	40,6	36,2	143	68	47,6
M4RT	0,25	0,003	40,8	36,2	144	40	27,8
M4RT	0	0	N/A	36,2	72	0	0,0
<b>95% Probit hodnota (neopravená):</b>			<b>5,1 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>3,9 – 7,2</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí 7násobného korekčního faktoru)</b>			<b>35,7 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>27,3 – 50,4</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí 10násobného korekčního faktoru)</b>			<b>51 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>39 – 72</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí průměrného korekčního faktoru)</b>			<b>43,3 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>33,2 – 61,2</b>	
Matrix	Hladina panelu (IFU/ml)	Hladina panelu (IFU/PCR)	Průměrná CT ohybu	Průměrná IC ohybu	Celkový počet platných N	Pozitivní detekce	% pozitivní
Moè	20	1,0	35,6	36,1	144	144	100,0
Moè	4	0,2	37,3	36,2	144	143	99,3
Moè	1	0,05	39,9	36,1	144	120	83,3
Moè	0,25	0,0125	40,6	36,0	144	71	49,3
Moè	0,125	0,00625	40,9	36,0	143	39	27,1
Moè	0	0	N/A	35,9	72	0	0,0
<b>95% Probit hodnota (neopravená):</b>			<b>2,1 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>1,5 – 3,0</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí 7násobného korekčního faktoru)</b>			<b>14,7 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>10,5 – 21,0</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí 10násobného korekčního faktoru)</b>			<b>21,0 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>15,0 – 30,0</b>	
<b>95% Probit hodnota (kopie cíle # pomocí průměrného korekčního faktoru)</b>			<b>17,9 IFU/ml</b>	<b>95% interval spolehlivosti</b>		<b>12,8 – 25,5</b>	

## Inkluzivita

Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 je schopen detekovat jednu IFU na PCR všech sérovarů *C. trachomatis*. Kvantifikované ATCC kultury 15 různých sérovarů *C. trachomatis* byly ředěny do média M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a normální lidské moči na koncentrace 80 IFU/ml resp. 20 IFU/ml. Tyto koncentrace představují vstup 1 IFU/PCR pro oba typy matrix. Dvacet dva (22) replikátů každého typu matrix pro každý sérovar bylo zpracováno testem COBAS® TaqMan® CT, v2.0. Všechny 15 sérovarů bylo detekováno při 100% pozitivitě pro každý typ matrixu.

## Reprodukovatelnost

Pro vyhodnocení reprodukovatelnosti testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 studovány dva čtyřčlenné panely, jeden připravený v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a další v normální lidské moči. Panely byly připraveny z kvantifikované ATCC kultury *C. trachomatis* a skladovány zmražené při -80 °C. Členové panelu byli připraveni v CT koncentracích 0, 40, 80 a 120 IFU/ml pro vzorky v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a 0, 10, 20 a 40 IFU/ml pro vzorky moči. Reprodukovatelnost byla hodnocena mezi šaržemi činidla a cykly zařízení (obsluhy). Každý pracovník provedl pětidenní testování každé ze tří šarží činidel.

2 700 výsledků této studie je shrnuto v Tabulce 3 pro zpracované vzorky média M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a Tabulce 4 pro zpracované vzorky moči. Negativní výsledky byly získány ve 100% ze 270 CT negativních vzorků u každé matrix. Celková reprodukovatelnost pro vzorky s médiem M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a močí je shrnuta v tabulce 3, resp. 4. Pro obě matrix byli všichni CT pozitivní členové pozitivní ve 100%. Hodnoty variačního koeficientu pro CT ohyb byly 2,3% nebo nižší pro replikáty M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a 4,2% nebo nižší pro replikáty moči, což prokazuje dobrou reprodukovatelnost kvalitativních výsledků tohoto testu.

**Tabulka 3**  
**Výsledky celkové reprodukovatelnosti pro buňky *C. trachomatis* v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.)**

CT cíle IFU/ml	0 IFU/ml	40 IFU/ml	80 IFU/ml	120 IFU/ml
Celkový počet platných replikátů	270	360	360	360
% pozitivních výsledků	0%	100%	100%	100%
Průměrná CT ohybu	0	35,3	34,3	33,7
Minimální hodnota	0	32,5	31,3	31,4
Maximální hodnota	0	39,1	37,1	37,8
Směrodatná odchylka	0	0,79	0,74	0,79
Variační koeficient	0	2,2%	2,2%	2,3%

**Tabulka 4**  
**Celková reprodukovatelnost výsledků pro buňky *C.trachomatis* v moči**

CT cíle IFU/ml	0 IFU/ml	10 IFU/ml	20 IFU/ml	40 IFU/ml
Celkový počet platných replikátů	<b>270</b>	<b>360</b>	<b>360</b>	<b>360</b>
% pozitivních výsledků	0%	100%	100%	100%
Průměrná CT ohybu	0	35,7	35,0	33,8
Minimální hodnota	0	34,1	33,2	31,9
Maximální hodnota	0	41,9	40,3	39,4
Směrodatná odchylka	0	1,02	1,35	1,41
Variační koeficient	0	2,9%	3,9%	4,2%

#### **Diagnostická senzitivita, diagnostická specifická a korelace**

Účinnosti testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a Testu BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD USA) byly porovnány analýzou vzorků endocervikálních výtěrů na tamponu v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) a moči odebrané od CT infikovaných a zdravých pacientů. Vzorky byly odebrány a testovány na pracovištích ve Švédsku s vysokou prevalencí švédské varianty kmene (nvCT).

Pomocí testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a testu BD ProbeTec ET bylo testováno celkem 758 vzorků moči (141 zmrazených archivovaných vzorků moči a 617 čerstvě odebraných vzorků moči). Dva soustavně neplatné vzorky byly vyjmuty ze sady vzorků. Diagnostická senzitivita pro vzorky moči činila 95,7 %. Diagnostická specifická činila 99,8 % a celková procentní shoda (viz Tabulka 5) pro vzorky moči byla 98,7 % mezi testem COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a testem BD ProbeTec ET. Při rozdělení výsledků moči podle pohlaví (viz tabulky 6 a 7), činila diagnostická senzitivita 95,9 % u mužských vzorků a 95,5% u ženských vzorků {Fisherův přesný test (p hodnota ~ 1,0)}, diagnostická specifická u mužských vzorků činila 99,8 % a 100 % u ženských vzorků {Fisherův přesný test (p hodnota ~ 1,0)} a celková procentní shoda činila 98,8 % u mužských vzorků a 98,4% u ženských vzorků {Fisherův přesný test (p-hodnota 0,7165)}. Fisherův přesný test indikuje nestatisticky významné rozdíly v korelaci u mužských, ženských nebo všech vzorků moči mezi dvěma testovacími metodami.

Pomocí testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a testu BD ProbeTec ET bylo testováno celkem 413 vzorků endocervikálních výtěrů na tamponu v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) (všechny čerstvě odebrané). Diagnostická senzitivita pro vzorky na tamponech v kultivačním transportním médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) činila 96,0 %. Diagnostická specifická činila 100 % a celková procentní shoda (viz Tabulka 8) pro endocervikální vzorky v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) činila 99,5 % mezi testem COBAS® TaqMan® CT, v2.0 a testem BD ProbeTec ET.

**Tabulka 5**  
**Souhrn výsledků testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 porovnaných s testem BD ProbeTec ET u vzorků moči od zdravých a CT infikovaných pacientů**

Celkem moč N=758		Test BD ProbeTec ET		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Test CTM CT, v2.0	Pozitivní	202	1	203
	Negativní	9	546	555
	Celkem	211	547	758

Diagnostická senzitivita =  $202/211 = 95,7 \%$  (95 % CI 92,0 %, 98,0 %)

Diagnostická specifická =  $546/547 = 99,8 \%$  (95 % CI 99,0 %, 100,0 %)

Celková % shoda =  $748/758 = 98,7 \%$  (95 % CI 97,6 %, 99,4 %)

**Tabulka 6**

**Souhrn výsledků testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 porovnaných s testem BD ProbeTec ET u vzorků mužské moči od zdravých a CT infikovaných pacientů**

Mužská moč N=569		Test BD ProbeTec ET		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Test CTM CT, v2.0	Pozitivní	139	1	140
	Negativní	6	423	429
	Celkem	145	424	569

Diagnostická senzitivita =  $139/145 = 95,9\%$  (95 % CI 91,2%, 98,5%)

Diagnostická specifita =  $423/424 = 99,8\%$  (95 % CI 98,7%, 100,0 %)

Celková % shoda =  $562/569 = 98,8\%$  (95 % CI 97,5 %, 99,5 %)

**Tabulka 7**

**Souhrn výsledků testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 porovnaných s testem BD ProbeTec ET u vzorků ženské moči od zdravých a CT infikovaných pacientů**

Ženská moč N=189		Test BD ProbeTec ET		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Test CTM CT, v2.0	Pozitivní	63	0	63
	Negativní	3	123	126
	Celkem	66	123	189

Diagnostická senzitivita =  $63/66 = 95,5\%$  (95 % CI 87,3 %, 99,0 %)

Diagnostická specifita =  $123/123 = 100,0\%$  (95 % CI 97,6%, 100,0 %)

Celková % shoda =  $186/189 = 98,4\%$  (95 % CI 95,4%, 99,7%)

**Tabulka 8**

**Souhrn výsledků testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 porovnaných s testem BD ProbeTec ET na vzorcích endocervikálních výtěrů v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) od zdravých a CT infikovaných pacientů**

M4RT® Endocervikální výtěry N=413		Test BD ProbeTec ET		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Test CTM CT, v2.0	Pozitivní	48	0	48
	Negativní	2	363	365
	Celkem	50	363	413

Diagnostická senzitivita =  $48/50 = 96,0\%$  (95 % CI 86,3 %, 99,5 %)

Diagnostická specifita =  $363/363 = 100,0\%$  (95 % CI 99,2 %, 100,0 %)

Celková % shoda =  $411/413 = 99,5\%$  (95 % CI 98,3%, 99,9%)

## Selhání celého systému

Míra selhání celého systému byla stanovena pro test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 ve 100 testech, každý v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) (10 IFU/ml) a moči (5 IFU/ml) při přibližně trojnásobku klinického limitu detekce (viz výsledky *Mez detekce* výše). Pozitivní výsledky byly získány u všech testů dvou typů vzorků s výslednou mírou selhání celého systému o hodnotě 0,0%.

## Interference

Interference testování byla provedena za použití vzorků v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) (10 IFU/ml) a moči (5 IFU/ml) při přibližně trojnásobku klinického limitu detekce pro každý typ vzorku (viz výsledky *Mez detekce* výše). CT pozitivní vzorky byly testovány v kombinaci s 18 volně prodejnými (OTC) ženskými hygienickými produkty, cervikálním hlenem a plnou krví. Všechny testované OTC produkty nevykázaly žádnou interferenci s detekcí signálu CT cíle nebo vnitřní kontroly. Přidání cervikálního hlenu nemělo žádný signifikantní efekt na detekci CT cíle nebo vnitřní kontroly. Nízký, ale reprodukovatelný CT cílový signál pozadí byl identifikován u vzorků na tamponech v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) obsahujících více než 7% plné krve. Zvýšený signál pozadí byl včas vždy pod prahem positivity analýzy a žádné falešně pozitivní výsledky nebyly obdrženy.

## Inhibice

Míra inhibice testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 byla stanovena pomocí negativních vzorků čerstvé a zmrazené moči a negativních vzorků endocervikálních výtěrů na tamponech v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) Media. Pomocí testu COBAS® TaqMan® CT, v2.0 bylo analyzováno celkem 910 klinických vzorků; 547 (544 čerstvých a 3 archivovaných) negativních vzorků moči a 363 negativních vzorků endocervikálních výtěrů v médiu M4RT® MicroTest Culture Transport System (Remel, Inc.) (tabulka 9). Počáteční testování odhalilo celkem 7 neplatných výsledků; 6 u vzorků čerstvé moči a 1 u výtěru na tamponu. Po opakovaném testování zůstaly neplatné 2 vzorky moči, což činilo míru inhibice 0,4 % pro vzorky moči a 0,2% pro všechny vzorky. Vzhledem k tomu, že jeden zbývající inhibiční vzorek moči byl mužský a jeden ženský, míra inhibice pro vzorky čerstvé moči u mužů činila 0,2 % a u míra inhibice u žen 0,8 %.

**Tabulka 9**  
**Test COBAS® TaqMan® CT, v2.0 - počáteční a konečné úrovně inhibice**

Zdroj vzorku	Celkový počet testů	Počet neplatných IC počáteční testování	% neplatných IC počáteční testování	Počet neplatných IC po opakovaném testování	% neplatných IC po opakovaném testování
Všechny negativní vzorky	910	7	0,8	2	0,2
Negativní vzorky čerstvé moči	544	6	1,1	2	0,4
Negativní vzorky čerstvé moči u mužů	421	5	1,2	1	0,2
Negativní vzorky čerstvé moči u žen	123	1	0,8	1	0,8
Negativní vzorky archivované moči	3	0	0	0	0
Negativní vzorky výtěrů	363	1	0,3	0	0

## LITERATURA

1. Mahony, J.B., Coombes, B.K., and Chernesky, M.A.. 2003. Chlamydia and Chlamydophila. In: Manual of Clinical Microbiology, (P.R. Murray, ed.) 8th ed., ASM Press, Washington, D.C., 991-1004.
2. Gerbase, A., Rowley J.T., and Mertens, T.E. 1998. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* **351**:(S3) 2-4.
3. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2006 Supplement. Chlamydial Prevalence Monitoring Project, Annual Report, Division of STD Prevention, Revised May 2008.
4. Institute of Medicine. The hidden epidemic: confronting sexually transmitted diseases. Eng TR, Butler WT, eds. National Academy Press, Washington DC, 1997.
5. Miller W.C., Ford C.A., Morris M., et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA*. 2004; **291**:2229-36.
6. Stamm WE, Jones RS, Batteiger BE. *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venerum, and Other Genital Infections). In Mandell G.L., Benett J.E., Dolin R., eds. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 6th ed. 2005. Elsevier, Churchill, Livingston: Vol 2.
7. Mullis, K. B., Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
8. Palmer, L. and Falkow, S. 1986. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 16:52-63.
9. Peterson, E. M. and de la Maza, L. M. 1988, Restriction endonuclease analysis of DNA from *Chlamydia trachomatis* biovars. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:625-629.
10. Longo, M. C., Berniger M. L. S., and Hartley J. L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**:125-128.
11. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* **10**:413-417.
12. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**:986-994.
13. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA: CLSI, 2005.
15. Schachter, J. and Stamm, W.E. 1995 Chlamydia. In: Manual of Clinical Microbiology, (P.R. Murray, ed.) 6th.ed., ASM Press, Washington, D.C., 669-677.
16. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000. 704.
17. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 2002 **51**: (NO. RR6): 1-78.

## Informace o revizi dokumentu

Doc Rev. 3.0  
6/2011

Odkazy na software AMPLILINK v3.2 byly v celém letáku odstraněny.

V části **NÁVOD K POUŽITÍ, Velikost cyklu**, bylo podáno vysvětlení tak, aby byl uživatel upozorněn, že se velikost cyklu skládá z celkem 24 vzorků s až 22 vzorky zavedenými na K-nosič.

Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.



Distributed by

COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0 vyrobil:

Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA  
Člen Roche Group

Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
Industriestrasse 7  
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Straße 116  
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL  
Avda. Generalitat, 171-173  
E-08174 Sant Cugat del Vallès  
Barcelona, Spain

Roche Diagnostics  
201, boulevard Armand-Frappier  
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877 273-3433)

Roche Diagnostics  
2, Avenue du Vercors  
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics S.p.A.  
Viale G. B. Stucchi 110  
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:  
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.  
Estrada Nacional, 249-1  
2720-413 Amadora, Portugal

Roche Diagnostica Brasil Ltda.  
Av. Engenheiro Billings, 1729  
Jaguaré, Building 10  
05321-010 São Paulo, SP Brazil

ROCHE, AMPLICOR, AMPERASE, AMPLILINK, COBAS, AMPLIPREP a TAQMAN jsou ochranné známky společnosti Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER je servisní známka společnosti Roche.

Microsoft a Windows jsou registrované obchodní známky nebo obchodní známky společnosti Microsoft Corporation ve Spojených státech anebo jiných zemích.

ProbeTec je registrovaná obchodní známka společnosti Becton Dickinson.

Eppendorf Repeater® a Eppendorf Combitip® jsou registrované obchodní známky společnosti Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburk, Německo.

M4RT® je registrovaná obchodní známka společnosti Remel Inc.

Kyaninová barviva v tomto produktu podléhají patentovým právům GE Healthcare Bio-Sciences Corp. a Carnegie Mellon University a jsou licencovány společnosti Roche pouze za účelem výzkumu a jako součást diagnostických sad *in-vitro*. Jakékoliv použití takových sad pro jiné účely než pro výzkum nebo *in-vitro* diagnostiku vyžaduje poskytnutí sublicence od společnosti GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, U.S.A. a Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.

Copyright 2011, Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

6/2011

Doc Rev. 3.0

(05096642001-04ENGL)

05230101001-03



Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim

