

**COBAS® AMPLICOR®**  
*Neisseria gonorrhoeae* Test

**NG**

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

<b>Objednáací údaje</b>	AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit	CT/NG PREP	100 Tests	P/N: 20759414 122 ART: 07 5941 4 US: 83315
	AMPLICOR® CT/NG Amplification Kit	CT/NG AMP	96 Tests	P/N: 20759902 122 ART: 07 5990 2 US: 83319
	COBAS® AMPLICOR® <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Detection Kit	NG DK	100 Tests	P/N: 20757535 122 ART: 07 5753 5 US: 83278
	COBAS® AMPLICOR® Detection Reagents Kit	DK	100 Tests	P/N: 20757470 122 ART: 07 5747 0 US: 83276
	COBAS® AMPLICOR® Wash Buffer Kit	WB	500 Tests	P/N: 20759899 123 ART: 07 5989 9 US: 83314

*Následující soupravu je možno použít k detekci Chlamydie trachomatis ve vzorcích amplifikovaných pomocí amplifikační soupravy AMPLICOR® CT/NG Amplification Kit. Detekce Chlamydia trachomatis se provádí podle uživatelské volby.*

COBAS® AMPLICOR® <i>Chlamydia trachomatis</i> Detection Kit	CT DK	100 Tests	P/N: 20757497 122 ART: 07 5749 7 US: 83277
---	-------	-----------	--

*Následující souprava se dá používat k detekci vnitřní kontroly CT/NG (CT/NG Internal Control, zkr. IC) amplifikované pomocí amplifikační soupravy AMPLICOR® CT/NG Amplification Kit. Pokud se testují vzorky moči nebo výtěry odebrané do kultivačního média na chlamydie, provádí se detekce vnitřní kontroly podle uživatelské volby. Pokud se však jedná o výtěry odebrané a přepravované za použití soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit, je detekce vnitřní kontroly povinná.*

COBAS® AMPLICOR® Internal Control Detection Kit	IC DK	100 Tests	P/N: 20757608 122 ART: 07 5760 8 US: 83281
---	-------	-----------	--

*Následující souprava se dá používat k odběru a přepravě endocervikálních a uretrálních výtěrů.*

AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit	STD SWAB	50 Tests	P/N: 20753920 122 ART: 07 5392 0 US: 83075
--	----------	----------	--

## Účel

COBAS® AMPLICOR® *Neisseria gonorrhoeae* (NG) Test je kvalitativní test *in vitro* pro detekci DNA *N. gonorrhoeae* v klinických vzorcích na přístroji COBAS® AMPLICOR® Analyzer. Při testu se využívá metody amplifikace nukleové kyseliny pomocí polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) a hybridizace nukleové kyseliny pro detekci bakterií *Neisseria gonorrhoeae* v urogenitálních vzorcích.

## Souhrn a výklad testu

*Neisseria gonorrhoeae* (gonokoky) jsou příčinou kapavky. Jedná se o gramnegativní diplokoky, cytochromoxidáza-pozitivní, nemotilní a nevytvářející spóry<sup>1-3</sup>. *N. gonorrhoeae* jsou geneticky úzce spřízněné s *N. meningitidis* (meningokoky), příčinou jednoho typu bakteriální meningitidy, a o něco méně úzce spřízněné s příležitostným lidským patogenem *N. lactamica*. Jak *N. gonorrhoeae*, tak *N. meningitidis* infikují pouze člověka. Existuje řada dalších druhů *Neisserie*, jež lze u člověka považovat za normální flóru; sem patří *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. sicca* a *N. subflava*<sup>1,2</sup>. Infekce gonokokem *Neisseria gonorrhoeae* vyvolává kapavku, což je třetí nejběžnější pohlavní choroba; celosvětově je hlášeno 62,2 milionů případů kapavky<sup>4</sup>. U mužů vede tato nemoc obecně k anteriorní uretritidě provázené hnisavým výtokem. U žen se tato nemoc objevuje nejčastěji v cervixu, může se ovšem infikovat i vagina a uterus<sup>2,5</sup>.

Presumptivní diagnóza kapavky vychází ze: zjištění gramnegativních intracelulárních diplokoků v gram-barvených stěrech uretrálních výtoků u mužů a endocervikálních sekretů u žen, z pomnožení *N. gonorrhoeae* z uretry (muži) resp. endocervixu na selektivních živných půdách s následným potvrzením typické morfologie kolonií, pozitivní oxidázové aktivity a typické gramnegativní diplokokové morfologie, popřípadě z detekce *N. gonorrhoeae* pomocí nekultivačních laboratorních testů. Definitivní diagnóza kapavky vyžaduje izolaci bakterie *Neisseria gonorrhoeae* z místa expozice kultivací (po dobu 48–72 hodin na selektivní půdě), prokázání typické morfologie kolonií, pozitivní oxidázový test, typickou gramnegativní morfologii a potvrzení izolatů kultury *N. gonorrhoeae* specifickými identifikačními metodami (produkce kyseliny z karbohydrátů, rychlé enzymatické testy, serologické zkoušky, testy na specifickou nukleovou kyselinu)<sup>1-3,5-7</sup>. Kultivace je třeba ke stanovení antimikrobiální susceptibility.

## Princip metody

COBAS® AMPLICOR® NG Test sestává ze čtyř základních postupů: vzorků, PCR amplifikace<sup>8,9</sup> terčové DNA pomocí NG-specifických komplementárních biotinylovaných primerů, hybridizace amplifikovaných produktů na oligonukleotidové sondy specifické pro terč(e) a detekce amplifikovaných produktů navázaných na sondu kolorimetrickým měřením.

Pro vypracování PCR testu je třeba vytipovat oblast terčové DNA, která se bude amplifikovat, syntetizovat dva krátké biotinylované oligonukleotidové primery, komplementární k oblastem lemujícím terčovou sekvenci. Tyto biotinylované primery se váží ke komplementární lemující oblasti a DNA polymeráza prodlužuje pomocí nadbytku deoxynukleotid-trifosfátů (dNTPs) v reakční směsi sekvenci ve směru od 5' k 3', čímž se vytváří biotinylovaná komplementární DNA sekvence nazývaná amplikon. Na pevný nosič (mikročástice) se naváže oligonukleotidová sonda specifická pro daný amplikon, která slouží k jeho hybridizaci (zachycení). V detekčním systému testu se používá konjugát avidinu s křenovou peroxidázou (HRP), který se na biotinylovaný amplikon zachycený na mikročástečích váže. Barevnou reakci zajišťuje substrát peroxidu vodíku a tetramethylbenzidinový (TMB) chromofor.

COBAS® AMPLICOR® NG Test umožňuje současnou amplifikaci terčové DNA *N. gonorrhoeae*, terčové DNA *C. trachomatis* a DNA vnitřní kontroly (IC) CT/NG. Činidlo Master Mix obsahuje dvojice biotinylovaných primerů specifické pro *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* a CT/NG IC. Detekci amplifikované DNA *C. trachomatis* je možno provádět podle uživatelské volby. **Detekce vnitřní kontroly CT/NG je nutná, pokud se testují výtěry odebrané a přepravené pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit.** Jedná-li se o vzorky moči nebo o výtěry odebrané a přepravené v kultivačním transportním médiu pro chlamydie, je detekce vnitřní kontroly CT/NG IC nepovinná.

### Příprava vzorků

Urogenitální epitelové buňky, leukocyty a s nimi spojené buňky *N. gonorrhoeae* se odebírají na tamponech nebo jsou peletizovány z moči. Na vzorky se působí roztokem detergentu, aby došlo k lýze buněk a z gonokoků se uvolnila DNA. Potom se přidá další roztok detergentu, kterým se vzorek připraví k amplifikaci.

### PCR amplifikace

#### Volba terčové sekvence

*Neisseria gonorrhoeae* obsahují vysoce zachovalou sekvenci DNA (M-*Ngo* PII), která na základě sekvenční homologie zřejmě kóduje cytosinovou DNA methyltransferázu, jež inhibuje digesci chromozomální DNA *Hae*III restriční endonukleázou. Genetická sekvence M-*Ngo* PII (zhruba 1044 párů bází) se vyskytuje v jednotlivých kmenech *N. gonorrhoeae*, zatímco ve většině ostatních, negonokokových druhů rodu *Neisseria* přítomna není<sup>10</sup>. Při testu COBAS® AMPLICOR® NG se používají biotinylované primery SS01 a SS02, kterými se definuje sekvence přibližně 201 nukleotidů v rámci genu M-*Ngo* PII v *N. gonorrhoeae*.

#### Amplifikace terče

Zpracované vzorky se přidávají do amplifikační směsi v amplifikačních zkumavkách (A-zkumavkách), ve kterých probíhá PCR amplifikace. Tepelný cyklizátor přístroje COBAS® AMPLICOR® Analyzer reakční směs zahřívá, aby se dvouřetězcová DNA denaturovala a exponovala specifické primerové terčové sekvence na genu *Neisseria gonorrhoeae* M-*Ngo* PII. biotinylovaných primerů SS01 a SS02 ke komplementární sekvenci DNA *N. gonorrhoeae*.

Tepelně stálá DNA polymeráza *Thermus aquaticus* (*Taq* pol), za přítomnosti nadbytku deoxynukleozid-trifosfátů (dNTPs), tj. deoxyadenozin-, deoxyguanozin-, deoxycytidin- a deoxyuridin- (místo deoxythymidin-) trifosfátu, prodlužuje primery po annealingu podél terčového templátu a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA s 201 párem bází, nazývanou amplikon. COBAS® AMPLICOR® Analyzer tento postup automaticky opakuje ve stanoveném počtu cyklů, přičemž v každém cyklu se množství amplikonové DNA efektivně zdvojnásobuje. Činidlo AMPLICOR® CT/NG Master Mix obsahuje také druhou sadu biotinylovaných primerů, které ve vzorku i ve vnitřní kontrole CT/NG podobným postupem, jaký jsme popsali pro *Neisseria gonorrhoeae*, souběžně amplifikují terčovou DNA *Chlamydia trachomatis* (CT).

### Amplifikace vnitřní kontroly

Při enzymatických amplifikačních postupech, jakým PCR je, se může účinnost snižovat v důsledku přítomnosti inhibitorů v klinickém vzorku. Zpracovávané vzorky, které obsahují látky, jež by mohly PCR amplifikaci rušit, je možno identifikovat pomocí vnitřní kontroly CT/NG. Vnitřní kontrola CT/NG je neinfekční plazmidová rekombinantní DNA s oblastmi vázajícími primer, jež jsou stejné jako v terčové sekvenci *C. trachomatis*, s randomizovanou vnitřní sekvencí podobné délky a složení bází jako u terčových sekvencí NG a CT a s jedinečnou oblastí vázající sondy, kterou se terčového amplikonu liší. Tyto vlastnosti byly zvoleny proto, aby se zajistila ekvivalentní amplifikace vnitřní kontroly CT/NG a terčové DNA CT/NG. Činidlo pro vnitřní kontrolu CT/NG je v amplifikační soupravě AMPLICOR® CT/NG obsaženo a zavádí se do každé amplifikační reakce k souběžné amplifikaci vedle terčové DNA z klinického vzorku. Souprava COBAS® AMPLICOR® Internal Control Detection Kit, která se dá přikoupit, obsahuje oligonukleotidovou záchytovou sondu specifickou pro vnitřní kontrolu, jež slouží ke zjištění pozitivního signálu vnitřní kontroly v reakční směsi. Pomocí vnitřní kontroly CT/NG se zjišťují vzorky obsahující inhibitory, které by rušily amplifikaci a detekci 20 nebo více kopií terčové nukleové kyseliny *N. gonorrhoeae*, jak je zjištěno Poissonovou analýzou. Při testování vzorků moči nebo výtěrů odebraných a přepravených v transportním médiu pro kultury chlamydií se detekce vnitřní kontroly CT/NG podle uživatelské volby provádět může, ale nemusí. **Pokud však jsou testovány výtěry odebrané a přepravené pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit, je detekce vnitřní kontroly CT/NG povinná.**

### Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace terčové DNA z klinických vzorků se při testu COBAS® AMPLICOR® NG dosahuje použitím enzymu AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridin- trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase pozná a katalyzuje destrukci řetězců DNA obsahujících deoxyuridin<sup>11</sup>, nikoli však řetězců DNA obsahujících deoxythymidin. Deoxyuridin není v přirozené DNA přítomen, vždy se však nachází v amplikonu, protože se v činidle Master Mix jako jeden z dNTPs používá deoxyuridin-trifosfát místo deoxythymidin-trifosfátu; proto je deoxyuridin obsažen pouze v amplikonu. Deoxyuridin činí kontaminující amplikon citlivým k destrukci enzymem AmpErase před amplifikací terčové DNA. Enzym AmpErase, který je v činidle Master Mix obsažen, katalyzuje štěpení DNA obsahující deoxyuridin na deoxyuridinových zbytcích tím, že otevírá deoxyribózový řetězec v poloze C1. Během zahřívání v prvním tepelném cyklu při alkalickém pH činidla Master Mix se DNA řetězec amplikonu štěpí v poloze deoxyuridinu, čímž se tato DNA stává neamplifikovatelnou. Při teplotách nad 55°C, tedy v průběhu teplotního cyklování, je enzym AmpErase inaktivní, a proto terčový amplikon nerozrušuje. Po amplifikaci je případně zbývající enzym denaturován přidávkem denaturačního roztoku, čímž se předejde rozrušení

terčového amplikonu. Prokázalo se, že enzym AmpErase v soupravě COBAS® AMPLICOR® NG Test inaktivuje minimálně 10<sup>3</sup> kopií deoxyuridin-obsahujícího amplikonu na jednu PCR.

#### Hybridizační reakce

Po PCR amplifikaci přidává přístroj COBAS® AMPLICOR® Analyzer automaticky do reakční směsi ve všech A-zkumavkách denaturační roztok, který vyvolává chemickou denaturaci amplikonu NG i amplikonu vnitřní kontroly CT/NG za tvorby jednořetězcové DNA. Z jednotlivých A-zkumavek analyzátor COBAS® AMPLICOR® převádí alikvotní podíly denaturovaného amplikonu do příslušných detekčních kelímků (D-kelímků). Do nich se pak přidává suspenze magnetických částic potažených oligonukleotidovou sondou specifickou pro *N. gonorrhoeae* (resp. vnitřní kontrolu, pokud s ní uživatel pracuje). Biotinem značený amplikon NG a amplikon vnitřní kontroly CT/NG je k terčově specifické oligonukleotidové sondě na magnetických částicích hybridizován. Hybridizací amplikonu k terčově specifické sondě se zvyšuje celková specifčnost testu.

#### Detekční reakce

Po hybridizační reakci opláchne COBAS® AMPLICOR® Analyzer v D-kelímku magnetické částice, aby z nich odstranil nenavázanou látku, a přidá konjugát avidinu s křenovou peroxidázou. Tento konjugát se naváže na biotinem značený amplikon hybridizovaný k terčově specifickým oligonukleotidovým sondám navázaným na magnetické částice. COBAS® AMPLICOR® Analyzer pak magnetické částice opláchne, aby odstranil nenavázaný konjugát, načež přidá do všech D-kelímků roztok substrátu obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5' tetramethylbenzidin (TMB). Za přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje navázaná křenová peroxidáza oxidaci TMB na barevný komplex, jehož absorbance u 660 nm se přístrojem COBAS® AMPLICOR® Analyzer proměňuje.

## Činidla

<b>AMPLICOR® CT/NG Specimen Preparation Kit AMPLICOR® CT/NG</b>	CT/NG PREP	100 testů	P/N: 20759414 122 ART: 07 5941 4 US: 83315
Souprava pro přípravu vzorků			

<b>CT/NG URINE WASH</b> (Promývací pufr CT/NG moč)	1 x 50 ml
---	-----------

Tris-HCl pufr  
300 mM NaCl  
< 0,1 % detergent  
0,09 % azid sodný

<b>CT/NG LYS</b> (Činidlo pro lýzu CT/NG)	1 x 25 ml
--	-----------

Pufr Tris-HCl  
< 1 % rozpouštědlo  
0,09 % azid sodný

<b>CT/NG DIL</b> (Ředidlo na vzorky CT/NG)	2 x 50 ml
---	-----------

Tris-HCl pufr  
6 mM chlorid hořečnatý  
< 25 % detergent  
0,05 % azid sodný

**AMPLICOR® CT/NG  
Amplification Kit**  
AMPLICOR® CT/NG  
Amplifikační souprava

CT/NG AMP

96 testů

P/N: 20759902 122  
ART: 07 5990 2  
US: 83319

**CT/NG MMX**

3 x 1,8 ml

(Činidlo Master Mix CT/NG)

Tris-HCl pufr  
EDTA  
100 mM KCl  
Glycerol  
< 0,01 % AmpliTaq® (*Taq* DNA polymeráza, mikrobiální)  
< 0,005 % dATP, dCTP a dGTP  
< 0,016 % dUTP  
< 0,01 % AmpErase® (uracil-N-glykosyláza) enzym (mikrobiální)  
< 0,0004 % primery SS01, SS02, CP24 a CP27, biotinylované  
0,05 % azid sodný

**CT/NG IC**

3 x 0,1 ml

(Vnitřní kontrola CT/NG)

Pufr Tris-HCl  
< 0,001 % neinfekční rekombinantní plazmidová DNA  
(mikrobiální) obsahující sekvence vážící CT primer  
a jedinečnou oblast vážící sondu  
< 0,005 % poly rA RNA (syntetická)  
EDTA  
Amarantové barvivo  
0,05 % azid sodný

**NG (+) C**

1 x 0,8 ml

[*N. gonorrhoeae* (+) kontrola]

Pufr Tris-HCl  
< 0,001 % neinfekční rekombinantní plazmidová DNA  
(syntetická) obsahující sekvence *N. gonorrhoeae*  
< 0,005 % nespecifický nosič DNA (savčí)  
< 0,5 % detergent  
EDTA  
0,05 % azid sodný

**CT (+) C**

1 x 0,8 ml

[*N. gonorrhoeae* (-) kontrola]

Pufr Tris-HCl  
< 0,001 % neinfekční rekombinantní plazmidová DNA  
(syntetická) obsahující sekvence *C. trachomatis*  
< 0,005 % nespecifický nosič DNA (savčí)  
< 0,5 % detergent  
EDTA  
0,05 % azid sodný

**COBAS® AMPLICOR®** NG DK 100 testů P/N: 20757535 122  
*Neisseria gonorrhoeae* ART: 07 5753 5  
**Detection Kit** US: 83278  
 COBAS® AMPLICOR®  
*Neisseria gonorrhoeae* Detekční souprava

**NG PS1** 1 x 100 testů

(Suspenze sondy pro NG č. 1)  
 MES pufr  
 < 0,3 % suspenze paramagnetických částic Dynabeads®  
 potažených oligonukleotidovou záchytovou sondou  
 SS06T5 specifickou pro *N. gonorrhoeae*  
 0,09 % azid sodný

**NG4** 1 x 100 testů

(Suspenze sondy pro NG č. 2)  
 Pufr s fosforečnanem sodným  
 37 % thiokyanát sodný  
 < 0,2 % rozpouštědlo

Xn X 37 % hm. thiokyanát sodný



Zdraví škodlivý

**COBAS® AMPLICOR®** DK 100 testů P/N: 20757470 122  
**Detection Reagents Kit** ART: 07 5747 0  
 COBAS® AMPLICOR® US: 83276  
 Souprava detekčních činidel

**DN4** 1 x 100 testů

(Denaturační roztok)  
 1,6 % hydroxid sodný  
 EDTA  
 Thymolová modř

Xi X 1,6 % hm. hydroxid sodný



Dráždivý

**CN4** 1 x 100 testů

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)  
 Pufr Tris-HCl  
 < 0,001 % konjugát avidinu s křenovou peroxidázou  
 Bovinní serumalbumin (savčí)  
 Emulsit 25 (Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co., Ltd.)  
 0,1 % fenol  
 1 % konzervační činidlo ProClin® 150

**SB3** 5 x 75 testů

(Substrát A)  
 Citrátový roztok  
 0,01 % peroxid vodíku  
 0,1 % konzervační činidlo ProClin® 150

**SB** 5 x 5 ml

(Substrát B)

0,1 % 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)

40 % dimethylformamid (DMF)

T 40 % hm. dimethylformamid (DMF)



Toxický

R: 61-20/21-36 Může poškodit plod. Při vdechování a styku s pokožkou je zdraví škodlivý. Dráždí oči.

S: 53-45 Nevystavujte se expozici – před použitím si vyžádejte speciální pokyny. V případě nehody nebo cítíte-li se nedobře, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc (pokud možno ukažte štítek).

**COBAS® AMPLICOR®**

**Wash Buffer**

**COBAS® AMPLICOR®**

Promývací pufr

WB

500 testů P/N: 20759899 123

ART: 07 5989 9

US: 83314

**WB** 2 x 250 testů

(Promývací koncentrát 10X)

< 2 % fosfátový pufr

< 9 % chlorid sodný

EDTA

< 2 % detergent

0,5 % konzervační činidlo ProClin® 300

## Upozornění a bezpečnostní pokyny

### *Pro diagnostické použití in vitro.*

Výrazem „kopie“ se v této metodické příručce míní 1 kopie terčové nukleové kyseliny *N. gonorrhoeae*. Jedna (1) kopie značí nejmenší množství terčové nukleové kyseliny *N. gonorrhoeae*, které by v PCR testu poskytlo pozitivní výsledek.

Tento test slouží ke zpracování pouze endocervikálních a uretrálních vzorků a vzorků moči. Není tedy určen pro žádné jiné typy vzorků, jako jsou výtěry krční nebo rektální.

Vzorky jsou stále po dobu, která je uvedena v oddíle „Odběr, přeprava a skladování vzorků“ této příbalové informace. Nicméně je na prospěch správnosti výsledků, jsou-li všechny vzorky testovány co nejdříve po odběru. Vlivy více proměnných, které představuje doba skladování a variace spojené s přepravou vzorků zkoumány nebyly.

Nepipetovat ústy.

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 zkušebními činidly si důkladně umyjte ruce.

Při odebrání alikvotních podílů z lahviček s činidly dbejte, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci. Doporučuje se používat sterilní pipety a špičky na jedno použití.

Nesměšujte dohromady činidlo z různých šarží, ani z různých lahviček téže šarže.

Nspotřebovaná činidla likvidujte v souladu s celostátními resp. místními předpisy.

Po vypršení lhůty použitelnosti již soupravu nepoužívejte.

Materiálové bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets, MSDS) lze obdržet na vyžádání od místního zastoupení firmy Roche.

Pracovní tok musí v laboratoři postupovat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru směrem k poamplifikačnímu prostoru (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Látky a vybavení se musí přiřadit jednotlivým předamplifikačním činnostem a nesmějí se používat k žádným jiným činnostem, ani se nesmějí přenášet mezi jednotlivými vyhrazenými prostory. Ve všech prostorech je třeba 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 terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

Se vzorky je třeba zacházet jako s infekčními a používat odpovídající laboratorní postupy, například ty, jež jsou uvedeny v publikaci *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*<sup>12</sup> nebo v dokumentu CLSI M29-A3<sup>13</sup>. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5 % roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

#### Poznámka

***Běžně prodávané tekuté bělicí přípravky pro domácnost obsahují chlornan sodný obvykle v koncentraci 5,25 %. Roztok o koncentraci 0,5 % tedy získáme zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1 : 10.***

COBAS® AMPLICOR® NG Test může reagovat s *N. subflava* a *N. cinerea*, což jsou organismy, které se mohou běžně vyskytovat v krční flóře. Dávejte proto pozor, abyste činidla pro zpracování vzorků, amplifikační činidla ani vzorky od pacientů nekontaminovali respiračními aerosoly.

Vzorky, jež laboratoř obdrží ještě s tamponem v roztoku AMPLICOR® STM, jsou pro testování **nepoužitelné**. Ty je třeba zlikvidovat a je nutno odebrat vzorek nový.

***Vzorky odebrané a přepravené pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit mohou inhibovat PCR. Při jejich testování je proto třeba provést detekci vnitřní kontroly CT/NG.***

V případě vzorků přepravených v **kultivačním transportním médiu pro chlamydie** je třeba ponechat tampony v kultivační přepravní zkumavce, aby se dala inokulace vzorku kontrolovat vizuálně. COBAS® AMPLICOR® NG Test byl hodnocen za použití vzorků přepravených i s tamponem ve zkumavce s médiem pro transport kultur chlamydií (Chlamydia culture transport medium, CTM). Vzorky CTM přepravené bez tamponů hodnoceny nebyly a pro tento test se nedoporučují.

Během skladování vzorků moči za pokojové teploty po dobu delší než 24 hodin může dojít k jejich degradaci. Vzorky moči uchovávané při pokojové teplotě déle než 24 hodin se testovat nemají.

**CT/NG URINE WASH, CT/NG LYS, CT/NG DIL, CT/NG MMX, CT/NG IC, NG (+) C, CT (+) C, NG PS1 a IC PS1** obsahují azid sodný. Ten 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.

Při manipulaci s **DN4, CN4, SB3, SB** a pracovním substrátem (směs činidel **SB3** a **SB**) noste prostředek na ochranu zraku, laboratorní plášť a rukavice na jedno použití. Dbejte, aby se tyto materiály nedostaly do styku s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud ke styku dojde, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody. Pokud byste tuto péči zanedbali, mohly by se na postiženém místě vyvinout popáleniny. Jestliže se některé činidlo rozlije nebo rozsype, před vytřením dosucha je zřeďte vodou.

Dbejte, aby se **SB** nebo pracovní substrát nedostal do styku s pokožkou nebo sliznicemi. Pokud se některá z těchto látek do styku s pokožkou dostane, okamžitě ji omyjte velkým množstvím vody.

**SB** a pracovní substrát obsahují dimethylformamid, který je ve vysokých orálních dávkách toxický a může poškodit plod. Je třeba dbát, aby nedošlo k jejich styku s pokožkou, vdechování výparů ani požití. Pokud ke styku s pokožkou dojde, omyjte ji důkladně vodou a mýdlem a vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

Vzorek i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohl vystříknout a nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků. *Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.*

## Požadavky na skladování a manipulaci

### *Činidla nezmrazujte.*

**CT/NG LYS** uchovávejte při teplotě 2–25°C. **CT/NG URINE WASH** a **CT/NG DIL** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Pokud se v některém z těchto činidel vytvoří během skladování sraženina, zahřejte činidlo před použitím na pokojovou teplotu a důkladně je promíchejte. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace.

**CT/NG MMX** a **CT/NG IC** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. Pracovní činidlo Master Mix (připravené přidáním **CT/NG IC** k **CT/NG MMX**) je třeba uchovávat při teplotě 2–8°C; pak je stálé 4 týdny.

**NG (+) C** a **CT (+) C** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace.

**NG PS1** a **NG4** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidla jsou stálá do vyznačeného data expirace. Pracovní činidlo připravené smísením **NG PS1** s **NG4** se uchovává při teplotě 2–8°C, při které je stálé 30 dní. Dá se použít nanejvýš na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

**DN4** uchovávejte za teplot 2–25°C. Činidlo **DN4** je stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření je **DN4** při teplotě 2–8°C stálé 30 dní (resp. do data expirace,

pokud je tato doba kratší). **DN4** se dá použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

**CN4** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Činidlo **CN4** je stálé do vyznačeného data expirace. Po otevření je **CN4** při teplotě 2–8°C stálé 30 dní (resp. do data expirace, pokud je tato doba kratší). **CN4** se dá použít maximálně na šest 12-hodinových přístrojových cyklů a mezi cykly se musí uchovávat při teplotě 2–8°C.

**SB3** a **SB** uchovávejte při teplotě 2–8°C. Neotevřená jsou tato činidla stálá do vyznačeného data expirace. Pracovní substrát se smísením **SB3** s **SB** připravuje denně. V přístroji COBAS® AMPLICOR® Analyzer je pracovní substrát stálý 16 hodin. **SB3**, **SB** ani pracovní substrát nesmí přijít do styku s kovy ani s oxidačními činidly a nesmí se vystavovat přímému světlu.

**WB** uchovávejte za teplot 2–30°C. Činidlo **WB** je stálé do vyznačeného data expirace. Před zředěním **WB** prohlédněte a zpozorujete-li sraženinu, kapalinu zahřejte na 30–37°C, aby se sraženina rozpustila. Pracovní promývací pufr (1X), připravený zředěním **WB** destilovanou nebo deionizovanou vodou v poměru 1 : 10, se v příslušném rezervoáru přístroje COBAS® AMPLICOR® uchovává za teplot 2–25°C; je pak stálý 2 týdny ode dne přípravy.

Částečně spotřebovaná detekční činidla uchovávejte mezi jednotlivými měřeními při teplotě 2–8°C. Před vložením do přístroje COBAS® AMPLICOR® Analyzer zkontrolujte, zda otevřeným nebo pracovním činidlům nevypršela doba použitelnosti.

## Materiály, které jsou součástí dodávky

**AMPLICOR® CT/NG  
Specimen Preparation Kit**  
AMPLICOR® CT/NG  
Souprava pro přípravu vzorků

CT/NG PREP

P/N: 20759414 122  
ART: 07 5941 4  
US: 83315

**CT/NG URINE WASH**  
(Promývací pufr na CT/NG moč)  
**CT/NG LYS**  
(Činidlo pro lýzu CT/NG)  
**CT/NG DIL**  
(Ředidlo na CT/NG vzorky)

**AMPLICOR® CT/NG  
Amplification Kit**  
AMPLICOR® CT/NG  
Amplifikační souprava

CT/NG AMP

P/N: 20759902 122  
ART: 07 5990 2  
US: 83319

**CT/NG MMX**  
(Činidlo Master Mix CT/NG)  
**CT/NG IC**  
(Vnitřní kontrola CT/NG)  
**NG (+) C**  
[Kontrola *N. gonorrhoeae* (+)]  
**CT (+) C**  
[Kontrola *C. trachomatis* (+)]

**COBAS® AMPLICOR®***Neisseria gonorrhoeae***Detection Kit**

COBAS® AMPLICOR®

*Neisseria gonorrhoeae* Detekční souprava

NG DK

P/N: 20757535 122

ART: 07 5753 5

US: 83278

**NG PS1**

(Suspenze sondy pro NG č. 1)

**NG4**

(Suspenze sondy pro NG č. 2)

**COBAS® AMPLICOR®****Detection Reagents Kit**

COBAS® AMPLICOR®

Souprava detekčních činidel

DK

P/N: 0757470 122

ART: 07 5747 0

US: 83276

**DN4**

(Denaturační roztok)

**CN4**

(Konjugát avidinu s křenovou peroxidázou)

**SB3**

(Substrát A)

**SB**

(Substrát B)

**COBAS® AMPLICOR®****Wash Buffer**

COBAS® AMPLICOR®

Promývací pufr

WB

P/N: 20759899 123

ART: 07 5989 9

US: 83314

**WB**

(Promývací koncentrát 10X)

## Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

**Odběr vzorků**

- Tampony na endocervikální a uretrální výtěry: Používejte pouze tampony s dakronovou, viskóзовou nebo kalciumalginátovou špičkou a plastovou nebo nehliníkovou tyčinkou
- Používejte pouze kultivační transportní média 2SP nebo SPG, chlamydiální transportní médium Bartels® ChlamTrans (Trinity Biotech Plc.), kultivační transportní systém M4® MicroTest nebo kultivační transportní systém M4RT® MicroTest (Remel, Inc.)
- Polypropylenové kelímky na odběr moči prosté konzervačních látek
- Kultivační transportní systém M4RT MicroTest ženský (x100) (Remel, Inc.)
- Kultivační transportní systém M4RT MicroTest mužský (x100) (Remel, Inc.)

**Předamplifikace – prostor pro přípravu činidel**

- A-kruh COBAS® AMPLICOR® osazený 12 A-zkumavkami
- Držák A-kruhu COBAS® AMPLICOR®
- Pipetu Eppendorf Multipette® se špičkou pro objem 1,25 ml Combitip® (sterilní, balení po jednom)

- Pipetory (objem 100 µl)\* s aerosolovou bariérou nebo se špičkami s pozitivním posuvem
- Rukavice na jedno použití bez pudru

#### **Předamplifikace – prostor pro přípravu vzorků a kontrol**

- 2,0 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem, sterilní, nesilikonované, konické (Sarstedt 72.693.005 nebo ekvivalentní)\*\*
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- Sterilní transferové pipety, dělené
- Pipetory (objem 50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 500 µl a 1000 µl)\* se špičkami s aerosolovou bariérou nebo „positive displacement“
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M nebo ekvivalentní
- Prodloužené špičky s aerosolovou bariérou (Matrix 7055 nebo ekvivalentní) na vzorky přepravené v kultivačním transportním médiu 2SP nebo SPG, v chlamydiálním transportním médiu Bartels ChlamTrans (Trinity Biotech Plc.), kultivačním transportním systému M4 MicroTest nebo kultivačním transportním systémem M4RT MicroTest (Remel, Inc.)
- 37°C ± 2°C Vyhřívací blok
- Vířivý mixer
- Savý papír
- Rukavice na jedno použití bez pudru

#### **Poamplifikace – prostor pro amplifikaci/detekci**

- COBAS® AMPLICOR® Analyzer a tiskárna
- Příručka (*Operator's Manual*) k přístroji COBAS® AMPLICOR® Analyzer
  - Volitelně: software AMPLILINK
  - Volitelně: Datová stanice pro software AMPLILINK s tiskárnou
  - Volitelně: Příručka uživatele k softwaru AMPLILINK verze 2.4 pro analyzátor COBAS® AMPLICOR® (pro použití se softwarem AMPLILINK verze 2.41) nebo Aplikační manuál k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro zařízení COBAS® AmpliPrep, analyzátor COBAS® TaqMan®, analyzátor COBAS® TaqMan® 48 a analyzátor COBAS® AMPLICOR® (pro použití se softwarem AMPLILINK verze 3.2).
- Metodická příručka k testu COBAS® AMPLICOR® *Neisseria gonorrhoeae*
- Stojany s D-kelímky
- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Serologické pipety 5 ml
- Odměrný válec (min. 1 litr)
- Vířivý mixér
- Rukavice na jedno použití bez pudru

\* Pipetory musejí být přesné na 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, je třeba používat špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky typu „positive displacement“, aby se předešlo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

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

## Odběr, přeprava a skladování vzorků

### Poznámka

*Se všemi vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčními.*

Přijatelné vzorky jsou pouze tyto:

1. Vzorky moči (mužské i ženské) přepravené v čistých polypropylenových nádobkách prostých konzervačních látek. **Pokud byly vzorky moči odebrány do nádobek, které konzervační látky obsahují, nelze je k testování použít.**
2. Endocervikální a uretrální výtěry odebrané a přepravované pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit.

**Při testování výtěrů přepravených soupravou AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit je detekce vnitřní kontroly CT/NG povinná.**

3. Endocervikální a uretrální výtěry musejí být odebrány a přepravovány v:
  - Kultivačním transportním médiu 2SP nebo SPG, chlamydiálním transportním médiu Bartels ChlamTrans (Trinity Biotech Plc.), kultivačním transportním systémem M4 MicroTest nebo kultivačním transportním systémem M4RT MicroTest (Remel, Inc.).

**V každé laboratoři je třeba šarže médií k použití kvalifikovat (podrobnosti viz v části „Kontrola kvality“).**

K získání spolehlivých výsledků je třeba řídit se pokyny pro správný odběr vzorků uvedenými níže. Test není určen pro krční ani rektální vzorky, ani pro žádné jiné typy vzorků než ty, které jsou výše uvedeny.

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

### Odběr vzorků

#### Vzorky moči

### Poznámka

*Je třeba zajistit, aby pacient nebyl vymočen dvě hodiny před odběrem.*

1. Do polypropylenové nádoby neobsahující žádnou konzervační přísadu se odebere 10–50 ml první zachycené moči (první části toku).
2. Nádobku se vzorkem těsně uzavřete a patřičně označte. Vzorek se může na testovací pracoviště přepravit za pokojové teploty, tj. 18–30°C.

**Výtěry odebrané do transportního média AMPLICOR® (AMPLICOR® Specimen Transport Medium, STM)**

1. Jedním z dodaných velkých tamponů odstraňte z ektocervixu hlen a tampon zlikvidujte.
2. Další velký tampon vložte do endocervikálního kanálu, až není špička vidět.

3. 3–5 sekund otáčejte a vyjměte; dbejte, aby nedošlo ke kontaktu s vaginálními povrchy.
4. Tampon vložte do zkumavky AMPLICOR® STM, intenzivně vířením promíchejte nebo tampon v kapalině 15 sekund protřepávejte.

**Poznámka**

***Pokud by tampon zůstal s STM ve styku déle než 15 sekund, mohlo by to mít za následek inhibici PCR.***

5. Tampon natlačte na stěnu zkumavky, abyste z něj vymáčkli kapalinu. Případný přebytečný hlen je nyní třeba odstranit nabráním na tampon. Tampon natlačte na stěnu zkumavky, abyste z hleny vymáčkli zbytkovou kapalinu. **Tampon i s případným přebytečným hlenem vyjměte a zlikvidujte.** Zkumavku uzavřete.
6. Nádobku se vzorkem těsně uzavřete a patřičně označte. Postupujte, jak je v laboratoři pro přepravu zavedeno. Až do přepravy do laboratoře uchovávejte vzorky při pokojové teplotě.

**Výtěry odebrané do kultivačního transportního média (Culture Transport Media, CTM)**

1. 1. Endocervikální a mužské uretrální výtěry je možno odebrat a přepravit v 1 až 3 ml kultivačního transportního média 2SP nebo SPG, chlamydiálního transportního média Bartels ChlamTrans (Trinity Biotech Plc.), kultivačního transportního systému M4 MicroTest nebo kultivačního transportního systému M4RT MicroTest (Remel, Inc.). K získání výtěrů po odstranění cervikálního hleny používejte doporučené metody<sup>15</sup>.
2. Používejte pouze tampony dakronové, viskózní nebo s kalciumalginátovou špičkou s plastovou nebo nehtiníkovou tyčinkou. Tampony s dřevěnými ani hliníkovými tyčinkami nepoužívejte.
3. Tampony ponechte v kultivačním transportním médiu. Nádobku se vzorkem těsně uzavřete a patřičně označte. Při odběru a transportu použijte zavedené postupy laboratoře. Pokud je doprava zpožděna tak, že by se vzorky do laboratoře dostaly po době delší než 1 hodina od odběru, je třeba výtěry zmrazit.

**Přeprava vzorků****Vzorky moči**

1. Vzorky moči se dají na testovací pracoviště přepravovat při teplotě 18–30°C (pokojová teplota). Při této teplotě jsou stále 24 hodin. Vzorky moči, které se nezpracují do 24 hodin od odběru, musejí být uchovávány při teplotě 2–8°C a zpracovány do 7 dnů od odběru. Vzorky, které není možno do 7 dnů od odběru zpracovat, se dají skladovat při teplotě –20°C nebo nižší a testovat do 30 dnů od odběru.
2. Vzorky moči, které je třeba odeslat do vzdáleného testovacího střediska, se musejí zaslat nepřetržitou dopravní službou se zaručeným předáním do 24 hodin; teplota pak může být pokojová (18–30°C). Jestliže se budou vzorky přepravovat při pokojové teplotě, je třeba je až do přepravy skladovat při teplotě 2–8°C, aby se zajistilo, že při pokojové teplotě nebudou uchovávány déle než 24 hodin. Při jejich přepravě musejí být splněny podmínky všech platných místních i celostátních předpisů pro dopravu etiologických látek<sup>14</sup>.

**Výtěry odebrané do transportního média AMPLICOR® (AMPLICOR® Specimen Transport Medium, STM)**

1. Na testovací pracoviště se vzorky dopravují za pokojové teploty. Výtěry jsou při teplotě 18–25°C stálé 10 dnů. Na testovacím pracovišti se uchovávají za pokojové teploty a je třeba je zpracovat do 10 dnů od odběru.
2. Výtěry, které je nutno odeslat do vzdáleného testovacího střediska, se až do expedice skladují při pokojové teplotě. Převážují se při teplotě 18–25°C a na místo musejí dorazit tak, aby se daly zpracovat do 10 dnů od odběru. Při jejich přepravě musejí být splněny podmínky všech platných místních i celostátních předpisů pro dopravu etiologických látek<sup>14</sup>.

**Výtěry odebrané do kultivačního transportního média (Culture Transport Media, CTM)**

1. Pokud je mezi dobou odběru a přepravou do laboratoře nebo ve zpracování vzorků prodleva delší než jedna hodina, ukládají se výtěry do chladničky. Výtěry, které se přepravují na vzdálené pracoviště, je třeba odeslat po odběru co nejdříve podle postupů dané laboratoře pro dopravu vzorků chlamydiálních kultur.
2. Výtěry, které se ve zkušební laboratoři netestují hned při příjmu, se uchovávají při teplotě 2–8°C a je nutno je zpracovat do 7 dnů od odběru. Výtěry, které do 7 dnů od odběru zpracovat nelze, je možno je skladovat až 30 dnů při teplotě –20°C nebo nižší.

**Uchovávání vzorků****Poznámka**

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

**Vzorky moči**

1. Vzorky moči, které se nezpracují do 24 hodin od odběru, musejí 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.

**Výtěry odebrané do transportního média AMPLICOR® (AMPLICOR® Specimen Transport Medium, STM)**

1. Výtěry jsou při pokojové teplotě stálé 10 dnů. Je třeba je uchovávat při pokojové teplotě a zpracovat do 10 dnů od odběru.
2. Až do doby přepravy se výtěry uchovávají při pokojové teplotě. Převážují se při pokojové teplotě a na testovací pracoviště se musejí dostat tak, aby se daly zpracovat do 10 dnů od odběru.

**Výtěry odebrané do kultivačního transportního média (Culture Transport Media, CTM)**

1. Výtěry, které se ve zkušební laboratoři netestují hned při příjmu, se uchovávají při teplotě 2–8°C a je nutno je zpracovat do 7 dnů od odběru. Pokud je do 7 dnů od odběru zpracovat nelze, musejí se uložit při teplotě –20°C nebo nižší a zpracovat do 30 dnů od odběru.

## Návod k použití

<b>Poznámka</b>	<i>Podrobné pokyny pro práci, tisk výsledků a vysvětlení značek a poznámek najdete v (1) Příručce uživatele k analyzátoru COBAS® AMPLICOR® a (2) jestliže používáte software AMPLILINK verze 2.41, přečtěte si Příručku uživatele k softwaru AMPLILINK verze 2.4 pro analyzátor COBAS® AMPLICOR®, nebo jestliže používáte software AMPLILINK verze 3.2, přečtěte si Aplikační manuál k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro zařízení COBAS® AmpliPrep, analyzátor COBAS® TaqMan®, analyzátor COBAS® TaqMan® 48 a analyzátor COBAS® AMPLICOR®.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Všechna činidla musejí mít před použitím teplotu okolí. Kde je tak uvedeno, používají se pipety s aerosolovou bariérou nebo se špičkami „positive displacement“. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Vzorky moči a stěry je třeba před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu. Kde je tak uvedeno, používají se pipety s aerosolovou bariérou nebo se špičkami „positive displacement“. Dávejte obzvláštní pozor, abyste zajistili selektivní amplifikaci.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Inhibici PCR je možno zmírnit tím, že se před přidáním vzorku k pracovní Master Mix uloží zpracované vzorky přes noc za teploty 2–8°C<sup>21</sup>.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Vzorek i kontrolní preparát se musí uchovávat ve zkumavkách se šroubovacím uzávěrem, aby nemohl vystríknout a aby nemohlo dojít ke vzájemné (křížové) kontaminaci vzorků. Zkumavky s nasazovací čepičkou nepoužívejte.</i>
<b>Množství pro jedno měření</b>	<i>Každá souprava obsahuje dostatek činidel na osm měření po 12 vzorcích, která je možno provést zvlášť nebo současně. Do každého souboru měření je třeba zařadit minimálně jeden replikát kontroly COBAS® AMPLICOR® <i>N. gonorrhoeae</i> (+) a jeden replikát kontroly COBAS® AMPLICOR® <i>C. trachomatis</i> (+) (viz oddíl „Kontrola kvality“).</i>
<b>Poznámka</b>	<i><b>Kontrola CT (+) slouží v testu COBAS® AMPLICOR® NG jako kontrola NG (–).</b></i>  <i>Činidla pro přípravu vzorků jsou v balení pro 100 testů. Kontroly NG (+) a CT (+) se dodávají v jednotlivých lahvičkách obsahujících dostatečné množství materiálu na přípravu 8 sad zpracovaných kontrol.</i>  <i>CT/NG Master Mix a vnitřní kontrola CT/NG se dodávají každé ve třech lahvičkách s materiálem postačujícím na proměření až 32 testů zahrnujících vzorky i kontroly. Pro co nejeefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.</i>
<b>Pracovní tok</b>	<i>Test COBAS® AMPLICOR® NG se dá provést během jediného dne, nebo se může rozložit do dvou dnů. Pokud se má test provést během jednoho pracovního dne, postupuje se postupně podle pokynů v částech <i>Příprava činidel</i>, <i>Příprava vzorků</i>, <i>Příprava kontrol</i>, <i>Amplifikace</i> a <i>Detekce</i>. Test lze také rozložit na dva dny, a to tak, že se první den provede <i>Příprava vzorků</i> a druhý den se pokračuje <i>Přípravou činidel</i>, <i>Přípravou kontrol</i>, <i>Amplifikací</i> a <i>Detekcí</i>. Také je možno první den provést <i>Přípravu činidel</i>, <i>Přípravu vzorků</i> a <i>Přípravu kontrol</i> a připravené vzorky a kontroly přidat do Master Mix a druhý den pak pokračovat <i>Amplifikací</i> a <i>Detekcí</i>.</i>
<b>Příprava činidel</b>	<b>Provádí se na pracovišti: Předamplifikace – prostor pro přípravu činidel</b>  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Stanovte potřebný počet A-kruhů pro testování vzorků od pacientů a kontrol. A-kruh(y) uložte do držáku(ů).</li></ol>

**Poznámka**

***I v případě, že vnitřní kontroly CT/NG nebudou detekovány, CT/NG IC musí být přidány do Master Mix.***

2. Pracovní Master Mix se připraví tak, že se do jedné lékovky **CT/NG MMX** přidá 100 µl **CT/NG IC**. *Objem Master Mix není třeba měřit. 100 µl CT/NG IC odměřte do celé lékovky CT/NG MMX.* Zkumavku opět uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10–15-krát obrátíte dnem vzhůru. Víření k promísení pracovní směsi Master Mix nepoužívejte. Růžové barvivo v **CT/NG IC** slouží k vizuální kontrole, že byl **CT/NG IC** k **CT/NG MMX** skutečně přidán. Zbývající **CT/NG IC** zlikvidujte. 10-násobným až 15-násobným obrácením dobře promíchejte. Pracovní Master Mix se uchovává při teplotě 2–8°C a musí se spotřebovat do 4 týdnů od přípravy.
3. Do každé A-zkumavky odměřte opakovací pipetou nebo pipetorem s aerosolovou bariérou nebo se špičkou „positive displacement“ 50 µl pracovní směsi Master Mix. **Čepičky A-zkumavek nyní nezavírejte.**
4. A-kruh(y) s pracovním Master Mix vložte do těsně uzavíratelného plastového vaku a vak bezpečně těsně uzavřete. A-kruh(y) přemístěte do předamplifikačního prostoru pro přípravu vzorků. V tomto prostoru je uložte při teplotě 2–8°C až do doby, než bude příprava vzorků a kontrol hotova. Pracovní směs Master Mix v A-zkumavkách utěsněných v plastovém vaku je při teplotě 2–8°C stálá 48 hodin.

**Příprava vzorků**

**Provádí se na pracovišti: Předamplifikace – Prostor pro přípravu vzorků**

**Vzorky moči**

1. Na každý vzorek od pacienta označte jednu 2,0 ml zkumavku se šroubovacím uzávěrem. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**
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 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 moči v uzávěru nepotřísnili rukavice. Pokud k tomu dojde, pak si předtím, než postoupíte k dalšímu vzorku, rukavice vyměňte za čisté.
4. Do příslušně značených zkumavek obsahujících **CT/NG URINE WASH** odměřte po 500 µl dobře promísené patientské moči. Na každý vzorek přitom použijte novou špičku. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
5. Inkubujte 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 novou špičku s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
9. Zkumavky po dobu 15 minut při pokojové teplotě inkubujte.

10. Do každé zkumavky odměřte 250 µl **CT/NG DIL**; použijte přitom pokaždé novou špičku s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
11. Zkumavky 10 minut centrifugujte při  $\geq 12\,500 \times g$ .
12. Zpracované vzorky je možno před odpipetováním alikvotních podílů do A-zkumavek obsahujících pracovní Master Mix uchovávat při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Pokud alikvotní podíly během 2 hodin do A-zkumavek odměřeny nebudou, je třeba zpracované vzorky uchovávat při teplotě 2–8°C. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C musí být testovány během 7 dnů.
13. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C je třeba před amplifikací vytemperovat na pokojovou teplotu a vířením důkladně promíchat. Po tomto promíchání se zpracované vzorky centrifugují 10 minut při  $\geq 12\,500 \times g$ .
14. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušných A-zkumavek po 50 µl supernatantu. Na každý vzorek přitom použijte novou špičku. **Dávejte pozor, abyste nenarušili peletu (nemusí být dobře vidět).** Do mapy A-kruhu si poznačte polohy jednotlivých patientských vzorků. A-zkumavky uzavřete.
15. 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 zpracování.

### Výtěry

#### *Výtěry přepravené v médiu AMPLICOR® Specimen Transport Medium (STM)*

#### **Poznámka**

*Při testování těchto vzorků je třeba provádět detekci vnitřní kontroly CT/NG.*

1. **Zkontrolujte transportní zkumavku se vzorkem AMPLICOR® STM. Pokud byl vzorek přepraven ve zkumavce s tamponem, je třeba jej vyřadit a odebrat vzorek nový.**
2. Do každé transportní zkumavky odpipetujte 1 ml **CT/NG DIL**; na každou zkumavku přitom použijte samostatnou sterilní pipetu.
3. Zkumavku uzavřete a 5-10 vteřinovým vířením důkladně promíchejte.
4. Po dobu 10 minut při pokojové teplotě inkubujte.
5. Do doby, než budou alikvotní podíly odměřeny do A-zkumavek obsahujících pracovní Master Mix, je možno zpracované vzorky uchovávat při pokojové teplotě až 2 hodiny. Pokud víme, že alikvotní podíly během 2 hodin do A-zkumavek neodměříme, je třeba zpracované vzorky uchovávat při teplotě 2–8°C. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C by měly být testovány během 4 dnů.
6. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C je třeba před amplifikací vytemperovat na pokojovou teplotu a vířením důkladně promíchat.
7. Pomocí mikropipety se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušných A-zkumavek po 50 µl jednotlivých zpracovaných vzorků. Do mapy A-kruhu si poznačte polohy jednotlivých patientských vzorků. Zkumavky uzavřete.
8. 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 4 dnů od zpracování.

*Výtěry přepravované v kultivačním transportním médiu (Culture Transport Medium, CTM)*

**Poznámka**

*Test COBAS® AMPLICOR® NG je vyhodnocen pouze pro použití s kultivačními transportními médii 2SP nebo SPG, chlamydiálním transportním médiem Bartels ChlamTrans (Trinity Biotech Plc.), kultivačním transportním systémem M4 MicroTest nebo kultivačním transportním systémem M4RT MicroTest (Remel, Inc.). Pokud by laboratoř chtěla používat jiné transportní médium, musí si vyhodnocení provést sama.*

1. **Zkontrolujte, zda zkumavka s kultivačním transportním médiem obsahuje tampon.** Pro vzorky, jež tampony neobsahují, nebyly u tohoto testu vypracovány provozní specifikace.
2. Na každý vzorek od pacienta označte jednu 2,0 ml zkumavku se šroubovacím uzávěrem. **Zkumavky s nasazovacím uzávěrem nepoužívejte.**
3. Do příslušně označených 2,0 ml polypropylenových zkumavek odměřte po 100 µl **CT/NG LYS**.
4. Vzorky vířením promíchejte. Pokud byly uchovávány ve zmrazeném stavu, nechte je nejprve za pokojové teploty 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. Pipetorem s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušné zkumavky obsahující **CT/NG LYS** 100 µl důkladně promíseného vzorku. Na každý vzorek přitom použijte novou špičku. Zkumavku uzavřete.
6. Po dobu 10 minut při pokojové teplotě inkubujte.
7. Do každé zkumavky odměřte 200 µl **CT/NG DIL**; na každý vzorek přitom použijte novou špičku s aerosolovou bariérou. Zkumavku uzavřete.
8. Po dobu 10 minut při pokojové teplotě inkubujte.
9. Do doby, než budou alikvotní podíly odměřeny do A-zkumavek obsahujících pracovní Master Mix, je možno zpracované vzorky uchovávat při pokojové teplotě až 2 hodiny. Pokud víme, že alikvotní podíly během 2 hodin do A-zkumavek neodměříme, je třeba zpracované vzorky uchovávat při teplotě 2–8°C. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C musí být testovány během 7 dnů.
10. Zpracované vzorky uchovávané při teplotě 2–8°C je třeba před amplifikací vytemperovat na pokojovou teplotu a vířením důkladně promístit.
11. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušných A-zkumavek po 50 µl jednotlivých zpracovaných vzorků. Na každý vzorek přitom použijte novou špičku. Do mapy A-kruhu si poznačte polohy jednotlivých patientských vzorků. A-zkumavky uzavřete.
12. 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 zpracování.

<b>Příprava kontrol</b>	<b>Provádí se na pracovišti: Předamplifikace – prostor pro přípravu vzorku a kontroly</b>
<b>Poznámka</b>	<i>Pracovní kontroly se připravují v den testování čerstvé. Na jeden den je možno si pro přípravu řady zpracovaných kontrol připravit po jedné pracovní kontrole, koncem dne se však musí zlikvidovat.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Kontrola NG (+) slouží v NG testu jako pozitivní kontrola. Kontrola CT (+) slouží v NG testu jako negativní kontrola.</i>
<b>Poznámka</b>	<i>Pokud se testují jak výtěry, tak vzorky moči, je třeba pro každý typ vzorku připravit samostatnou sadu kontrol.</i>
<b>Část A. Pracovní kontroly:</b>	<p><b>Připravte si tyto pracovní kontroly NG (+) a NG (-).</b></p> <p>A1. Pomocí sterilní pipetové špičky odměřte do dvou 2,0 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 1 ml <b>CT/NG DIL</b>. Jednu zkumavku označte „Pracovní kontrola NG (+)“, druhou „Pracovní kontrola NG (-)“.</p> <p>A2. <b>NG (+) C</b> i <b>CT (+) C</b> 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.</p> <p>A3. Pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Pracovní kontrola NG (+)“ 100 µl roztoku <b>NG (+) C</b>.</p> <p>A4. Pomocí pipetoru novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Pracovní kontrola NG (-)“ 100 µl roztoku <b>CT (+) C</b>.</p> <p>A5. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Uchovávejte při pokojové teplotě a koncem pracovního dne je zlikvidujte.</p>
<b>Část B. Vzorky moči a výtěry AMPLICOR® STM:</b>	<p><b>Připravte si tyto zpracované kontroly NG (+) a NG (-).</b></p> <p>B1. Pomocí sterilní pipetové špičky odměřte do dvou 2,0 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 250 µl <b>CT/NG LYS</b>. Jednu zkumavku označte „Zpracovaná kontrola NG (+)“, druhou „Zpracovaná kontrola NG (-)“.</p> <p>B2. Pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola NG (+)“ 250 µl pracovní kontroly NG (+).</p> <p>B3. Pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola NG (-)“ 250 µl pracovní kontroly NG (-).</p> <p>B4. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Po dobu 10 minut při pokojové teplotě inkubujte. Uchovávejte při pokojové teplotě a koncem pracovního dne je zlikvidujte.</p> <p>B5. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušných A-zkumavek po 50 µl zpracovaných kontrol. A-zkumavky uzavřete a polohy zpracovaných vzorků a kontrol si poznačte do mapy A-kruhu.</p> <p>B6. Zpracované vzorky (tj. patientské vzorky a kontroly) v A-kruzích přeneste do poamplifikačního prostoru. <i>Tyto vzorky připravené k PCR lze uchovávat teplotě 2–8°C až 16 hodin.</i></p>

**Část C.  
Výtěry CTM:****Připravte si tyto zpracované kontroly NG (+) a NG (-).**

- C1. Pomocí sterilní pipetové špičky odměřte do dvou 2,0 ml polypropylenových zkumavek se šroubovacím uzávěrem po 100 µl **CT/NG LYS**. Jednu zkumavku označte „Zpracovaná kontrola NG (+)“, druhou „Zpracovaná kontrola NG (-)“.
- C2. Do zkumavek obsahujících **CT/NG LYS** odměřte pomocí sterilní pipetové špičky po 100 µl kultivačního transportního média.
- C3. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte.
- C4. Pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola NG (+)“ 200 µl pracovní kontroly NG (+).
- C5. Pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do zkumavky označené „Zpracovaná kontrola NG (-)“ 200 µl pracovní kontroly NG (-).
- C6. Zkumavky uzavřete a vířením důkladně promíchejte. Po dobu 10 minut při pokojové teplotě inkubujte. Uchovávejte při pokojové teplotě a koncem pracovního dne je zlikvidujte.
- C7. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou odměřte do příslušných A-zkumavek po 50 µl zpracovaných kontrol. A-zkumavky uzavřete a polohy zpracovaných vzorků a kontrol si poznačte do mapy A-kruhu.
- C8. Zpracované vzorky (tj. patientské vzorky a kontroly) v A-kruzích přemístěte do poamplifikačního prostoru. **Tyto vzorky připravené k PCR lze uchovávat teplotě 2–8°C až 16 hodin.**

**Amplifikace a  
detekce****Provádí se na pracovišti: Poamplifikace – prostor pro amplifikaci a detekci****Provádějte denní údržbu zařízení, včetně:**

- Otřít inicializační podstavec vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušit
- Otřít špičku zařízení pro manipulaci s D-keřímkou vlhkým hadříkem nepouštějícím vlas a osušit
- Zkontrolovat rezervoár s promývacím kufrem a v případě potřeby doplnit
- Pracovní promývací pufr (1X) připravíte následujícím postupem. Prohlédněte **WB**, a pokud v čínidle zpozorujete sraženinu, zahřátím na 30–37°C ji rozpustíte. 1 objem **WB** přidejte k 9 objemům destilované nebo deionizované vody a dobře promíchejte. Dobře promíchejte. V zásobníku promývacího pufru udržujte soustavně náplň promývacího pufru (1X) minimálně 3–4 litrů.
- Vyprázdnit nádobu na odpad
- Systém naprimertejte
- Během primingu zkontrolujte stříkačky a trubičky
- Během primingu zkontrolujte transferové špičky

**Před každým souborem měření:**

- Zkontrolujte nádobu na odpad a podle situace ji vyprázdněte
- Zkontrolujte rezervoár na promývací pufr a podle situace pufr doplňte
- Vyměňte stojany s použitými D-kelímky
- Systém napriměrujte

**Plnění a provoz analyzátoru COBAS® AMPLICOR®**

1. Zkontrolujte v přístroji COBAS® AMPLICOR® Analyzer množství činidel. Připravte si dostatek kazet, abyste s nimi vystačili.
2. **NG PS1** vířením důkladně promíchejte. Do kazety s **NG4** přidejte 2,5 ml **NG PS1** a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou lékovku od **NG PS1** zlikvidujte. Na kazetě s **NG4** vyznačte datum přípravy.

**Poznámka**

*Nebude-li se provádět detekce vnitřní kontroly, přejděte ke kroku č. 4, jinak pokračujte krokem č. 3.*

**Poznámka**

*Pokud se výtěry odebírají a přepravují pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit, je detekce vnitřní kontroly CT/NG povinná.*

3. **IC PS1** vířením důkladně promíchejte. Do kazety obsahující **IC4** přidejte 2,5 ml **IC PS1** a kazetu uložte do příslušného stojanu, specifického pro daný test. Použitou k lékovku od **IC PS1** zlikvidujte. Na kazetě s **IC4** vyznačte datum přípravy činidla.
4. Připravte pracovní substrát tak, že do jedné kazety s **SB3** odpipetujete 5 ml **SB**. K promísení pipetujte nahoru a dolů. Prázdnou lékovku od **SB** zlikvidujte. Na kazetě s **SB3** vyznačte datum přípravy.
5. Pracovní substrát uložte do příslušného (generického) stojanu.
6. Kazety s **DN4** a **CN4** uložte do příslušných stojanů na generická činidla. Na kazetě vyznačte datum, kdy byla otevřena.
7. Identifikujte stojany s činidly jako obecné nebo testové pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK.
8. Nakonfigurujte stojany s činidly tak, že pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK vložíte pozice činidel a čísla šarží do analyzátoru COBAS® AMPLICOR®.
9. Vložte stojany s činidly do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK. Dbejte, aby byla každá kazeta s činidlem ve své přiřazené pozici a aby ve stojanu těsně seděla.
10. Stojan na D-kelímky vložte na plošinu pro D-kelímky. Pro každou detekci vzorku nebo kontroly je zapotřebí jeden D-kelímek, dva D-kelímky jsou zapotřebí pro každou kazetu s pracovním substrátem k provedení slepého pokusu pomocí analyzátoru COBAS® AMPLICOR®.
11. A-kruh(y) uložte do segmentu(ů) tepelného cyklizátoru přístroje COBAS® AMPLICOR® Analyzer.

12. Vložte A-kruhy do analyzátoru COBAS® AMPLICOR® pomocí tlačítek, skeneru čárových kódů nebo pomocí software AMPLILINK.
13. Vytvořte pracovní seznam A-kruhu.
14. Kryt segmentu(ů) tepelného cyklizátoru těsně uzavřete.
15. Spusťte analyzátor COBAS® AMPLICOR®.
16. Vyčkejte, dokud analyzátor COBAS® AMPLICOR® neohlásí, že kontrola vložení proběhla úspěšně.

**Poznámka**

*COBAS® AMPLICOR® Analyzer umožňuje provést u obsahu každé A-zkumavky až 6 samostatných detekcí. COBAS® AMPLICOR® Analyzátor si sám vypočítá potřebná množství jednotlivých činidel a na počátku každého měření zkontroluje, jestli jich má pro požadovaný test dostatek.*

17. Amplifikaci a detekci provádí přístroj COBAS® AMPLICOR® Analyzer automaticky. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty absorbance u 660 nm a jako pozitivní, negativní nebo nejednoznačné na základě porovnání absorbance s předem stanovenou mezní hodnotou, specifickou pro daný test.

## Kontrola kvality

V každém souboru měření musí být zahrnuto minimálně po jednom replikátu zpracované kontroly NG (+) a NG (-). 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. Pokud jde o polohu kontrol a vzorků v A-kruhu (kruzích), nejsou zde žádná doporučení.

### Negativní kontrola

Absorbance kontroly NG (-) u 660 nm musí být nižší než 0,2. Pokud je absorbance kontroly NG (-) rovna nebo vyšší než 0,2, je celý soubor měření neplatný a celý postup, tedy včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce, je třeba zopakovat. Jestliže je absorbance kontroly NG (-) vyšší než 0,2 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

Kontrola NG (-) obsahuje nehomologickou DNA (sekvence *C. trachomatis*) a slouží ke sledování případné kontaminace činidel nebo zařízení terčovou DNA.

### Pozitivní kontrola

Absorbance kontroly NG (+) u 660 nm musí činit minimálně 2,0. Pokud je tato absorbance kontroly NG (+) nižší než 2,0, je celý soubor měření neplatný a celý postup, tedy včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce, je třeba zopakovat. Jestliže je absorbance kontroly NG (+) nižší než 2,0 soustavně, spojte se s místním zastoupením firmy Roche a vyžádejte si technickou pomoc.

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

### Validace tamponů pro odběr vzorku a transportní média pro kulturu

Nové šarže odběrových tamponů a kultivačních transportních médií (CTM), kterými se výtěry přepravují do laboratoře k testování soupravou COBAS® AMPLICOR® NG Test, je třeba pro použití v testu kvalifikovat, aby se zaručilo, že tampony ani média neobsahují látky, jež by rušily PCR. Od místního zastoupení firmy Roche si vyžádejte materiál „Specimen Collection Swab and Transport Media Validation Procedure“.

### Kontrola správného postupu testování vzorků

K otestování účinnosti zpracování vzorků přidejte do zkumavky s validovaným kultivačním transportním médiem nebo s AMPLICOR® STM 10<sup>4</sup> *N. gonorrhoeae* (lze obdržet od American Type Culture Collection) a inkubujte při pokojové teplotě jednu hodinu. Takto nastříknuté vzorky zpracujte a otestujte příslušným postupem pro výtěry, jak je popsáno v této metodické příručce. Správně zpracované vzorky musejí v testu COBAS® AMPLICOR® NG Test poskytnout pozitivní výsledek s absorbancí u 660 nm minimálně 0,2.

## Výsledky

### Interpretace výsledků

#### Bez detekce vnitřní kontroly

1. Projděte si, co přístroj k danému měření vytiskl, a na příznacích a poznámkách si ověřte, že je měření platné. Pokud platné není, je třeba celý postup, tedy včetně přípravy vzorků, amplifikace a detekce, opakovat.
2. Jestliže je měření platné, lze výsledky vzorků interpretovat takto:

A <sub>660</sub>	FLG	Poznámka	Interpretace
< 0,2	—	NEGATIVE	DNA <i>N. gonorrhoeae</i> nedetekována. Vzorek se jeví vůči <i>N. gonorrhoeae</i> jako negativní. Negativní výsledek však infekci <i>N. gonorrhoeae</i> nevylučuje, protože výsledky jsou odvislé od správného odběru vzorků, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečného množství detekované DNA.
≥ 0,2	—	POSITIVE	DNA <i>N. gonorrhoeae</i> detekována. Vzorek se jeví vůči <i>N. gonorrhoeae</i> jako pozitivní. <b>Výsledky je však třeba potvrdit opakovaným testováním.</b>

3. U vzorků, které se jeví jako pozitivní na *N. gonorrhoeae*, je třeba výsledek opakovaným testováním potvrdit. V případě vzorků moči a výtěrů v CTM zpracujte další podíl původního vzorku, nebo si vyžádejte vzorek nový a proveďte jeden test. V případě tamponů přepravených v AMPLICOR® Specimen Transport Media proveďte jeden test s původním zpracovaným vzorkem. Konečná interpretace testu je dána výsledky opakovaného testu. Vzorky vykazující v opakovaném testu hodnotu A<sub>660</sub> ≥ 0,2 jsou na *N. gonorrhoeae* pozitivní. Vzorky vykazující v opakovaném testu hodnotu A<sub>660</sub> < 0,2 se považují vůči *N. gonorrhoeae* za negativní.

### Poznámka

*Urogenitální vzorky obsahující křížově reaktivní nepatogenní druhy Neisseria mohou v prvním i opakovaném testu poskytnout pozitivní výsledky<sup>20</sup>. Jsou-li tedy některé vzorky interpretovány jako pozitivní, neznamená to ještě, že N. gonorrhoeae obsahují. Vliv těchto falešně pozitivních výsledků na funkčnost testu bude záviset na prevalenci gonokokové infekce v dané populaci (viz oddíl „Omezení metody“).*

### Interpretace výsledků

#### S detekcí vnitřní kontroly

1. Projděte si, co přístroj k danému měření vytiskl, a na příznacích a poznámkách si ověřte, že je měření platné. Pokud platné není, musíte celý postup (tj. přípravu vzorku, amplifikaci a detekci) zopakovat.
2. V případě platného měření se vzorky poskytující A<sub>660</sub> < 0,2 interpretují takto:

Výsledek vzorku na NG			Výsledek vzorku vnitřní kontroly			Interpretace
A <sub>660</sub>	FLG	Poznámka	A <sub>660</sub>	FLG	Poznámka	
< 0,2	—	NEGATIVE	≥ 0,20	—	POSITIVE	DNA <i>N. gonorrhoeae</i> nedetekována. Vzorek se jeví vůči <i>N. gonorrhoeae</i> jako negativní. Negativní výsledek však infekci <i>N. gonorrhoeae</i> nevylučuje, protože výsledky jsou odvislé od správného odběru vzorků, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečného množství detekované DNA.
< 0,2	—	NEGATIVE	< 0,20	—	NEGATIVE	Inhibovaný vzorek. Pokud je DNA <i>N. gonorrhoeae</i> přítomna, není detekovatelná. Zpracujte další podíl původního vzorku a test zopakujte. Inhibitory jsou často labilní a vzorky, které byly původně inhibované, již při opakování inhibované být nemusejí. Pokud již není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový.

3. V případě platného měření se vzorky s hodnotou  $A_{660} \geq 0,2$  považují vůči *N. gonorrhoeae* za pozitivní bez ohledu na výsledek vnitřní kontroly. Tyto vzorky je třeba k potvrzení výsledku ještě jednou otestovat. Jedná-li se o vzorky moči nebo výtěrů v CTM, zpracuje se další podíl původního vzorku a provede se jeden test. V případě výtěrů přepravených ve zkumavkách pro transport vzorků AMPLICOR® se provede jeden test původního zpracovaného vzorku. Konečná interpretace testu těchto vzorků je určena výsledky z jeho opakování:

Výsledek vzorku na NG	Výsledek vzorku vnitřní kontroly	Interpretace
≥ 0,2	Jakákoliv hodnota	Vzorek je na <i>N. gonorrhoeae</i> pozitivní.
< 0,2	≥ 0,20	Vzorek se jeví jako vůči <i>N. gonorrhoeae</i> jako negativní
< 0,2	< 0,20	Neplatný negativní výsledek. Vzorek je s ohledem na <i>N. gonorrhoeae</i> nejednoznačný. Test je třeba s novým podílem původního vzorku zopakovat.

**Poznámka**

*Urogenitální vzorky obsahující křížově reaktivní nepatogenní druhy *Neisseria* mohou v prvním i opakovaném testu poskytnout pozitivní výsledky<sup>20</sup>. Jsou-li tedy některé vzorky interpretovány jako pozitivní, neznamená to ještě, že *N. gonorrhoeae* obsahují. Vliv těchto falešně pozitivních výsledků na funkčnost testu bude záviset na prevalenci gonokokové infekce v dané populaci (viz oddíl „Omezení metody“).*

## Nač je třeba při postupu dbát

Pracovní tok musí v laboratoři probíhat jednosměrně, od předamplifikačního prostoru směrem k prostoru poamplifikačnímu (amplifikace/detekce). Předamplifikační činnosti začínají přípravou činidel a pokračují přípravou vzorků. Každá předamplifikační činnost musí mít své vyhrazené materiály a vybavení, které se nesmějí používat pro jiné činnosti ani přemísťovat mezi jednotlivými prostory. Ve všech prostorech je třeba 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 terčové DNA. Poamplifikační materiály a vybavení musí vždy zůstat v poamplifikačním prostoru.

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správné fungování tohoto testu věcí zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké analytické citlivosti testu je třeba věnovat mimořádnou péči tomu, aby se zachovala čistota reagensů soupravy a amplifikačních směsí. U všech činidel je třeba čistotu bedlivě sledovat. Jakmile je na kontaminaci podezření, je třeba činidlo zlikvidovat.

## Omezení

Na funkčnost testu může mít vliv prevalence gonokokové infekce v dané populaci. Při testování populace s nízkou prevalencí nebo osob bez rizika infekce pozitivní prediktivní hodnoty klesají. Jelikož v některých populacích nebo skupinách pacientů může být prevalence *N. gonorrhoeae* nízká, může být 4 %-5 % četnost falešně pozitivních výsledků dokonce vyšší než četnost výsledků skutečně pozitivních a výpovědní (prediktivní) hodnota pozitivního testu bude v těchto případech velmi malá. Jelikož někteří skutečně infikovaní pacienti nebudou testováním jednoho vzorku na kultivaci zjištěni, není možno skutečnou četnost falešně pozitivních výsledků z klinických údajů ani stanovit či odhadnout. Četnost falešně pozitivních výsledků může záviset na kvalifikaci a obratnosti pracovníků, zacházení s činidly nebo vzorky a dalších faktorech dané laboratoře. Pokud by měla mít falešně pozitivní diagnóza *N. gonorrhoeae* závažné důsledky, je třeba zvážit, zda by se neměl k potvrzení provést další test amplifikace nukleové kyseliny, nebo ještě raději test kultivační<sup>4</sup>. Při testování antimikrobiální susceptibility a uchování pro lékařsko-právní účely se kultivace vyžaduje. Viz oddíl *Funkční charakteristiky, Prediktivní hodnoty*.

COBAS® AMPLICOR® NG Test se k hodnocení nedoporučuje při podezření na sexuální zneužití či při jiných lékařsko-právních indikacích.

Pokud by v jakékoliv situaci mohly falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky mít negativní zdravotní, sociální nebo psychologické dopady, doporučuje se provést další testování.

Orofaryngeální aerosoly a další zdroje orofaryngeální kontaminace falešně způsobují s vysokou četností pozitivní výsledky na *N. gonorrhoeae*. COBAS® AMPLICOR® NG Test může nepatogenní izoláty *N. subflava* a *N. cinerea* detekovat. Tyto organismy mohou být součástí normální krční flóry.

Je třeba dbát, aby se činidla pro zpracování vzorků, amplifikační činidla ani vzorky od pacientů nekontaminovaly respiračními aerosoly.

Detekce *N. gonorrhoeae* odvisí od počtu organismů ve vzorku a vliv na ni mohou mít metody odběru vzorků, faktory pacienta, jako je věk, anamnéza pohlavních chorob nebo výskyt symptomů, stádium infekce a infikující kmen *Neisseria gonorrhoeae*.

V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní. Souprava COBAS® AMPLICOR® NG Test obsahuje vnitřní kontrolu CT/NG, která umožňuje zjistit zpracované vzorky obsahující látku, jež by mohly PCR amplifikaci více než 20 kopií/test rušit.

***Při testování výtěrů odebraných a přepravených pomocí soupravy AMPLICOR® STD Swab Specimen Collection and Transport Kit je třeba provádět detekci vnitřní kontroly CT/NG.***

Laboratoře, které testování na *Neisseria gonorrhoeae* pomocí soupravy COBAS® AMPLICOR® CT/NG Test zavádějí, svěřují tuto činnost novým pracovníkům nebo mění postup testu či odběru vzorků, by měly vnitřní kontrolu CT/NG využívat při testování vzorků moči nebo výtěrů přepravených v transportním médiu pro kultury chlamydií ke stanovení míry inhibice u své testované populace. Podle výsledků tohoto výchozího hodnocení se pak může laboratoř rozhodnout, jestli bude ve vnitřní kontrole CT/NG u těchto typů vzorků pokračovat nebo ne.

Spolehlivost výsledků závisí na odběru adekvátních vzorků a správném uplatnění příslušných přepravních postupů.

Adekvátnost vzorků je možno posoudit pouze mikroskopickým prozkoumáním cylindrických epitelových buněk v nich.

Testujte pouze indikované typy vzorků. COBAS AMPLICOR® *Neisseria gonorrhoeae* Test byl validován za použití ženských endocervikálních výtěrů, mužských uretrálních výtěrů a ženské i mužské moči. Pokud by byly testovány jiné typy vzorků, mohly by být výsledky falešně negativní nebo falešně pozitivní. U vzorků krčních výtěrů je vysoká pravděpodobnost, že poskytnou výsledky falešně pozitivní.

Díky přidavku enzymu AmpErase k činidlu Master Mix je amplifikace terčové DNA selektivní; aby se však předešlo kontaminaci činidel, je třeba uplatňovat zásady správné laboratorní praxe a důsledně dodržovat postupy, jež jsou v této metodické příručce uvedeny.

Testem nelze určit, zda bude terapie úspěšná nebo neúspěšná.

Jak je tomu i u každého jiného testu, je třeba výsledky z testu COBAS® AMPLICOR® NG Test interpretovat s uvážením všech klinických zjištění a laboratorních nálezů.

Se soupravou by měli pracovat pouze pracovníci vyškolení v technikách PCR.

Test COBAS® AMPLICOR® NG poskytuje kvalitativní výsledky. Mezi absorbancí signálu pozitivního testu COBAS® AMPLICOR® NG a počtem buněk *N. gonorrhoeae* v infikovaném vzorku nelze hledat žádnou korelaci.

Pro COBAS® AMPLICOR® NG Test, kdy se testuje moč, se doporučuje zachytit první náhodný vzorek moči, čímž se miní prvních 10–50 ml proudu moči. Vlivy proměnných, jako je první zachycená moč vs střední podíl toku, hodnoceny nebyly.

Variabilní vliv na funkčnost testu může mít druh a objem kultivačního transportního média, kterým se výtěry do laboratoře pro testování soupravou COBAS® AMPLICOR® NG Test přepravují.

## Rušivé látky

Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní výsledky.

Mezi rušivé látky patří zejména:

- U lubrikantu Replens® bylo zjištěno, že inhibuje PCR a může v tomto testu vést k falešně negativním výsledkům.
- Přítomnost hlenu v cervikálním vzorku může inhibovat PCR a vést k falešně negativním výsledkům. Pro optimální funkčnost testu se doporučuje používat vzorky hlenu prosté. Před odběrem vzorku se doporučuje odstranit cervikální sekrece a výtoky větším tamponem<sup>19</sup>.
- Vzorky obsahující více než 5 % obj. krve mohou poskytovat výsledky falešně pozitivní. V klinických studiích bylo 681 z 2265 ženských výtěrů krvavých, avšak četnost falešně pozitivních výsledků u nich nebyla zvýšena.

## Funkční charakteristiky

### Analytická specifčnost: Kultury buněk a virů

Specifičnost testu COBAS® AMPLICOR® NG byla hodnocena přidáním kultur buněk nebo virů k CTM a k normální lidské moči. CTM a moč byly zpracovány a testovány postupem COBAS® AMPLICOR® NG test. Mezi testovanými organismy byla řada organismů, které je možno izolovat z urogenitálního traktu. Reaktivitu v testu COBAS® AMPLICOR® NG nevykazoval žádný z těchto organismů nebo virů:

<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Lactobacillus parabuchnerri</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Acinetobacter</i> subsp. <i>genospecies 3</i>	<i>Legionella bozemanii</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Mobiluncus curtsii</i> subsp. <i>curtsii</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus curtsii</i> subsp. <i>holmesii</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Bacteriodes fragilis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Bacteroides gracilis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Bifidobacillus longum</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Neisseria elongata</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Neisseria kochii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> W135
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Pasteurella maltocida</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Pediococcus acidilactica</i>
<i>Chromobacter violaceum</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Clostridium innocuum</i>	<i>Prevotella bivia</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Prevotella corporis</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Cytomegalovirus	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Deinococcus radiopugnans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Derxia gummosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Echerichia coli</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Epstein Barr Virus	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Ewingella americana</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus dysgalatia</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Streptococcus equinus</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Herpes simplex virus 1	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Herpes simplex virus 2	<i>Streptococcus salivarius</i>
Lidský papilloma virus typ 16	<i>Streptococcus sanguis</i>
Lidský papilloma virus typ 18	<i>Streptomyces griseinus</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Treponema pallidum</i> *
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Lactobacillus crispus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus jensenii</i>	
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>Lactobacillus oris</i>	

\* Ke zpracovanému CTM nebo moči byla přidána přečištěná DNA.

Ani kmeny *N. subflava* a *N. cinerea* získané z American Type Culture Collection v testu COBAS® AMPLICOR® NG nereagovaly, avšak dva izoláty *N. subflava* a jeden izolát *N. cinerea* vykazovaly testu COBAS AMPLICOR zkříženou reaktivitu. Jednalo se o izoláty získané z krčních výtěrů normálních osob.

**Analytická citlivost:  
Přečištěná DNA**

Při stanovení analytické citlivosti na přečištěnou terčovou DNA se prokázalo, že COBAS® AMPLICOR® NG Test dokáže reprodukovatelně detekovat 5 nebo více kopií přečištěné DNA *N. gonorrhoeae* na jednu reakci PCR. Počet kopií DNA *N. gonorrhoeae* použitých v experimentu byl stanoven Poissonovou analýzou.

**Přesnost**

Přesnost testu COBAS® AMPLICOR® NG v rámci jednoho souboru měření, mezi různými soubory měření, mezi různými dny a celková přesnost byla stanovena pomocí kontroly NG (+). Ta byla zpracována a následně nařazena puřy pro zpracování vzorků na koncentraci 0, 5, 10 a 20 DNA kopií/amplifikační reakci. Během osmi dnů testovali tři pracovníci jednou denně pět identicky opakovaných vzorků (replikátů) každé koncentrace DNA. Denně tedy bylo testováno 15 replikátů každé koncentrace DNA, což představuje celkem 120 testů (viz tab. 1).

**Tabulka 1**  
**Přesnost testu COBAS® AMPLICOR® NG Test\***

NG terč Počet kopií/PCR	0 Kopií/PCR	5 Kopií/PCR	10 Kopií/PCR	20 Kopií/PCR
Celk. počet replikátů	240	240	240	240
Průměr absorbancí	0,052	3,668	3,944	3,982
Minimální hodnota	0,003	0,010	0,286	3,389
Maximální hodnota	1,397	4,000	4,000	4,000
Mezi dny				
Směrod. odchylka	0,0129	0**	0**	0**
Variační koeficient	24,6 %	0**	0**	0**
Mezi měřeními				
Směrod. odchylka	0,06210	0,32115	0,13892	0,01919
Variační koeficient	118,4 %	8,8 %	3,5 %	0,5 %
V rámci jednoho měření				
Směrod. odchylka	0,16961	0,61534	0,31968	0,06687
Variační koeficient	323,6 %	16,8 %	8,1 %	1,7 %
Celková				
Směrod. odchylka	0,18108	0,69410	0,34856	0,06957
Variační koeficient	345,5 %	18,9 %	8,8 %	1,7 %

\* Výpočty byly provedeny podle směrnice CLSI (EP5A)<sup>18</sup> pro hodnocení přesnost v rámci jednoho souboru měření a celkové přesnosti.

\*\* Odhad komponenty variance byl záporný, a proto byl položen rovný nule.

**Prediktivní hodnoty**

Na funkčnost testu může mít vliv prevalence gonokokové infekce v dané populaci. Při testování populace s nízkou prevalencí nebo osob bez rizika infekce pozitivní prediktivní hodnoty klesají. Jelikož v některých populacích nebo skupinách pacientů může být prevalence *N. gonorrhoeae* nízká, může být 4 %-5 % četnost falešně pozitivních výsledků dokonce vyšší než četnost výsledků skutečně pozitivních a výpovědní (prediktivní) hodnota pozitivního testu bude v těchto případech velmi malá. Jelikož někteří skutečně infikovaní pacienti nebudou testováním jednoho vzorku na kultivaci zjištěni, není možno skutečnou četnost falešně pozitivních výsledků z klinických údajů ani stanovit či odhadnout. Četnost falešně pozitivních výsledků může záviset na kvalifikaci a obratnosti pracovníků, zacházení s činidly nebo vzorky a dalších faktorech dané laboratoře. Pokud by měla mít falešně pozitivní diagnóza *N. gonorrhoeae* závažné důsledky, je třeba zvážit, zda by se neměl k potvrzení provést další test amplifikace nukleové kyseliny, nebo ještě raději test kultivační.<sup>4</sup> Při testování antimikrobiální susceptibility a uchování pro lékařsko-právní účely se kultivace vyžaduje.

Hypotetické pozitivní a negativní prediktivní hodnoty (PPV a NPV) pro různé četnosti prevalence při citlivosti 97,1 % a specifičnosti 98,1 % udává tabulka 2.

**Tabulka 2**  
**COBAS® AMPLICOR® CT/NG Test na *Neisseria gonorrhoeae***  
**Hypotetické prediktivní hodnoty pro různé četnosti prevalence**

Prevalence (%)	Citlivost (%)	Specifičnost (%)	Pozitivní prediktivní hodnota (%)	Negativní prediktivní hodnota (%)
1	97,1	98,1	34,5	99,9
5	97,1	98,1	73,3	99,8
10	97,1	98,1	85,3	99,7
20	97,1	98,1	92,9	99,3

### Klinické použití

COBAS® AMPLICOR® NG Test byl hodnocen klinickou studií provedenou na jednom pracovišti. Celkem bylo testováno 135 ženských endocervikálních výtěrů, 134 vzorky ženské moči, 48 mužských uretrálních výtěrů a 48 vzorků mužské moči. Testem COBAS® AMPLICOR® NG byly vyšetřovány odpovídající si výtěry a vzorky moči od jednotlivých pacientů (od jedné pacientky nebyla moč k dispozici). Kultury sloužily na některých pracovištích jako referenční test.

Rozporné vzorky byly analyzovány opakováním testu COBAS® AMPLICOR® NG a provedením PCR s jinou terčovou DNA sekvencí specifickou pro *N. gonorrhoeae* (část genu 16S rRNA). Výsledky byly zpracovány dvěma způsoby. Při první metodě (analýza na jeden vzorek) byly identifikovány referenční test-negativní infekce pomocí výsledků PCR pouze pro jeden typ vzorků, tedy buď pro výtěr nebo pro moč. Pacient byl klasifikován jako pozitivní na infekci, jestliže byl pozitivní referenční test nebo jestliže byl hodnocený typ vzorku PCR-pozitivní pro primární i alternativní terč. Při druhé metodě (analýza na jednoho pacienta) byly identifikovány referenční test-negativní infekce pomocí výsledků PCR pro výtěr i moč od jednoho pacienta. Pacient byl klasifikován jako pozitivní na infekci, jestliže byl pozitivní referenční test nebo jestliže byl jeden z obou typů vzorků PCR-pozitivní pro primární i alternativní terč.

Parametry testu byly vypočítávány pro každý typ vzorku zvlášť. Citlivost a specifičnost byla vypočtena v porovnání s referenčními výsledky, výsledky členěnými na jednotlivé vzorky a výsledky členěnými na jednotlivé pacienty. Skutečná míra klinické citlivosti a specifičnosti testu COBAS® AMPLICOR® NG se odvozuje z porovnání s výsledky členěnými podle jednotlivých pacientů.

**Funkčnost vůči NG bez použití vnitřní kontroly vs kultura**

Pracov.	Kategorie vzorků	N	Prevalence	vs kultura		vs rozlišené výsledky			
				Citlivost	Specifičnost	na 1 vzorek		na 1 pacienta	
						Citlivost	Specifičnost	Citlivost	Specifičnost
1	Mužská moč	48	52,1 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
				(25/25)	(23/23)	(25/25)	(23/23)	(25/25)	(23/23)
	Mužský výtěr	48	52,1 %	100,0 %	91,3 %	100,0 %	91,3 %	100,0 %	91,3 %
				(25/25)	(21/23)	(25/25)	(21/23)	(25/25)	(21/23)
	Ženská moč	134	20,8 %	63,6 %	94,6 %	70,4 %	99,1 %	67,9 %	99,1 %
				(14/22)	(106/112)	(19/27)	(106/107)	(19/28)	(105/106)
	Ženský výtěr	135	20,7 %	86,4 %	92,9 %	88,5 %	96,3 %	82,1 %	96,3 %
				(19/22)	(105/113)	(23/26)	(105/109)	(23/28)	(103/107)

**Funkčnost vůči NG při použití vnitřní kontroly vs kultura**

Pracov.	Kategorie vzorků	N	Prevalence	Inhibice	vs kultura		vs rozlišené výsledky			
					Citlivost	Specifičnost	na 1 vzorek		na 1 pacienta	
								Citlivost	Specifičnost	
1	Mužská moč	48	52,1 %	0,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
				(0/48)	(25/25)	(23/23)	(25/25)	(23/23)	(25/25)	(23/23)
	Mužský výtěr	48	52,1 %	2,1 %	100,0 %	91,3 %	100,0 %	91,3 %	100,0 %	91,3 %
				(1/48)	(25/25)	(21/23)	(25/25)	(21/23)	(25/25)	(21/23)
	Ženská moč	134	20,8 %	9,7 %	70,0 %	94,4 %	76,0 %	99,0 %	76,0 %	99,0 %
				(13/134)	(14/20)	(101/107)	(19/25)	(101/102)	(19/25)	(109/102)
	Ženský výtěr	135	20,7 %	0,7 %	86,4 %	92,9 %	88,3 %	96,3 %	82,1 %	96,3 %
				(1/135)	(19/22)	(105/113)	(23/26)	(105/109)	(23/28)	(103/107)

---

## Literatura

1. Sparling, P.F. 1990. Biology of *Neisseria gonorrhoeae*, in Sexually Transmitted Diseases (Holmes, K.K., Mardh, P-A, Sparling, P.F. and Wiesner, P.J., ed.) Second Edition, McGraw-Hill, New York, 131-147.
2. Knapp, J.S. and Koumans, E. H. 1999. Neisseria and Branhamelia, in Manual of Clinical Microbiology (P.R. Murray, ed.) 7th Edition, ASM Press, Washington, D.C., 586-603.
3. Mardh, P-A and Danielson, D. 1990. *Neisseria gonorrhoeae*, in Sexually Transmitted Diseases (Holmes, K.K., Mardh, P-A, Sparling, P.F., and Wiesner, P.J., ed.) Second Edition, McGraw-Hill, New York, 131-147.
4. Gerbase, A., Rowley J.T., and Mertens, T.E. 1998. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* **351**:(S3) 2-4.
5. Hook III, E.W. and Handsfield, H.H. 1990. Gonococcal infections in the adult, in Sexually Transmitted Diseases. (Holmes, K.K., Mardh, P-A, Sparling, P.F., and Wiesner, P.J., ed.) Second Edition, McGraw-Hill, New York, 131-147.
6. Guide for the Diagnosis of Gonorrhea Using Culture and Gram Stained Smear. 1991. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA 30333.
7. Laboratory Methods for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases. 1991. American Public Health Association.
8. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. et al. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
9. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in-vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335-350.
10. Miyada, C.G. and Born, T.L. 1991. A DNA sequence for the discrimination of *Neisseria gonorrhoeae* from other Neisseria species. *Molecular and Cellular Probes* **5**: 327-335.
11. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125-128.
12. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 1999. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 4th Edition. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

13. 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.
14. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.
15. Evangelista, A.T. and Bilstein, H.R. 1993. Cumitech 4A: Laboratory Diagnosis of Gonorrhoea. (C. Abramson, ed.) ASM Press, Washington, D.C.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline – Third Edition. CLSI Document C24-A3 Wayne, PA: CLSI, 2006.
17. Hook, E.W. and Zenilman, J.M. 1998. Gonorrhoea, in Infectious Diseases , (Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., and Blacklow, N.R., ed.) Second Edition, W.B. Saunders, Philadelphia PA, 969-974).
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices-Second Edition; Approved Guideline. CLSI Document EP5-A Villanova, PA: CLSI, 1999.
19. Guidelines for Treatment of Sexually Transmitted Diseases. Morbidity and Mortality Weekly Reports 1998 (No. RR-1): 1-118.
20. Van Der Pol, B., Martin, D.H., Schacter, J., Quinn, T.C., Gaydos, C.A., Jones, R.B., Crotchfelt, K., Moncada, J., Jungkind, D., Turner, B., Peyton, C., Kelly, J.F., Weiss, J.B. and Rosenstraus, M. Enhancing the specificity of the COBAS AMPLICOR CT/NG Test for *Neisseria gonorrhoeae* by Retesting Specimens with Equivocal Results. Journal of Clinical Microbiology 2001 **39**: 3092-3098.
21. Toye, B., Woods, W., Bobrowska, M., and Ramotar K. 1998. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. Journal of Clinical Microbiology **36**:2356-2358.





Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA  
A Member of the Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics  
Indianapolis, IN 46256 USA  
(For Technical Assistance call the  
Roche Response Center®  
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics  
H7V 4A2 Laval, Quebec  
(For Technical Assistance call:  
Pour toute assistance technique,  
appeler le: 1-877-273-3433

Roche Diagnostics (Schweiz) AG  
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics  
F-38240 Meylan

Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim, Germany

Distributore in Italia:  
Roche Diagnostics SpA  
Piazza Durante 11  
20131 Milano

Roche Diagnostics S.L.  
E-08006 Barcelona

Distribuidor em Portugal:  
Roche Farmacêutica Química, Lda  
P-2700 Amadora

ROCHE, AMPLICOR, AMPLILINK, AMPLIPREP, AMPLITAQ, TAQMAN,  
AMPERASE a COBAS jsou obchodní značky společnosti Roche.  
ROCHE RESPONSE CENTER je servisní značka společnosti Roche.

Bartels® je registrovaná obchodní známka ve vlastnictví člena skupiny Trinity  
Biotech Plc. nebo jemu licencovaná.

Paramagnetické částice Dynabeads® jsou licencovány v rámci patentů ve  
vlastnictví společnosti Dynal Biotech, ASA, Oslo, Norway. Dynabeads® je  
registrovaná obchodní známka společnosti Dynal Biotech ASA, Oslo, Norsko,  
licencovaná subjektu Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, Indiana.

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

M4® a M4RT® jsou registrované obchodní známky společnosti Remel, Inc

Pipetman® je registrovaná obchodní známka společnosti Gilson Medical  
Electronics, Inc.

ProClin® je registrovaná obchodní známka společnosti Rohm and Haas Company.

Replens® je registrovaná obchodní známka společnosti Columbia Laboratories  
Inc.

Copyright 2007, Roche Molecular Systems, Inc.  
Všechna práva vyhrazena.

5/2007

(00058003563-03ENGL)  
04497457001-02



Roche Diagnostics GmbH  
D-68298 Mannheim

