

PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

| | | | |
|--|----------|-----------|--|
| COBAS® TaqMan® MTB Test | CTM MTB | 48 Tests | P/N: 04803531 190 |
| AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation Kit | RSP PREP | 100 Tests | P/N: 20756903 122 ART: 07 5690 3 US: 83267 |

ÚČEL POUŽITÍ

Test COBAS® TaqMan® MTB je amplifikační test *in vitro* nukleové kyseliny sloužící ke kvalitativnímu stanovení komplexu DNA *Mycobacteria tuberculosis* (MTB) ve zkapalněných, dekontaminovaných a koncentrovaných vzorcích z lidských dýchacích cest, včetně sputa a bronchoalveolárních laváží (BAL). Pro manuální přípravu vzorků test využívá soupravu pro přípravu vzorků z dýchacích cest AMPLICOR® a pro automatickou amplifikaci a detekci používá analyzátor COBAS® TaqMan® 48.

SOUHRN A VÝKLAD TESTU

Zástupci rodu *Mycobacterium* jsou acidorezistentní, nepohyblivé, aerobní nesporulující bakterie ve tvaru tyček. Zahrnují několik druhů, které jsou patogenní pro člověka. Mnohé z druhů mykobakterií jsou saprofyty v půdě a vodě. Primárně patogenní pro člověka jsou druhy patřící do komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*) a *M. leprae*. *M. tuberculosis* je nejdůležitější mykobakteriální patogen a postihuje pouze člověka.

Tuberkulóza (TB) je nakažlivé onemocnění. Stejně jako běžné nachlazení se šíří vzduchem. Nakažliví jsou pouze lidé, kteří jsou postiženi plicní formou TB. Nakažení lidé při kašláním, kýchním, hovoru nebo pliváním rozšiřují bakterie TB do vzduchu. K nákaze člověka stačí vdechnutí i malého množství těchto bakterií. V současné době je bakterií TB nakažena celkově jedna třetina světové populace. Z lidí, kteří jsou nakaženi bakterií TB, 5-10 % onemocní nebo se někdy během svého života stanou infekčními. Odhaduje se, že v roce 2004 TB způsobila 1,7 milionu úmrtí. Co do počtu onemocnění je nejvyšší počet odhadovaných úmrtí v jihovýchodní Asii, ale nejvyšší mortalita per capita je v Africe, kde onemocnění HIV vedlo k rychlému nárůstu výskytu TB a zvyšuje i pravděpodobnost úmrtí na TB. WHO si klade do roku 2005 za cíl, jak potvrdilo i Světové zdravotnické shromáždění v roce 1991, detekovat 70 % nových případů infekce TB a vyléčit 85 % z nich. Osmnáct zemí již tohoto cíle dosáhlo v roce 2002¹⁻⁵.

Kvůli riziku šíření choroby, potenciálnímu vzniku kmenů rezistentních na léky a závažnosti onemocnění u pacientů infikovaných HIV-1 je rychlá diagnóza komplexu *M. tuberculosis* extrémně důležitá.

Izolace organismu z komplexu *M. tuberculosis* je nezbytná k definitivní diagnóze tuberkulózy. Rutinní kultivace jsou časově náročné a mohou trvat až osm týdnů. Mikroskopické vyšetření acidorezistentních stěrů je nejrychlejší metodou k detekci mykobakterií, ale je málo senzitivní a nespecifické. Imunologické a sérologické techniky jsou omezené kvůli nízké senzitivitě, případně specifitě^{6,7}. Vývoj testů založených na PCR specifických pro mykobaktérie dále zlepšil rychlou diagnostiku tuberkulózy tím, že umožnil přímou detekci mykobakterií v klinických vzorcích⁸⁻¹⁴.

PRINCIPY POSTUPU

Test COBAS® TaqMan® MTB je založen na dvou hlavních procesech: (1) manuální příprava vzorku pro získání DNA MTB; (2) simultánní PCR amplifikace cílové DNA za použití komplementárních primerů a detekce cílové DNA pomocí rozštěpených dvojitě fluorescenčně značených oligonukleotidových sond^{15,16}. Spolu tyto procesy umožňují detekci amplifikačního produktu cílové MTB (amplikonu) a DNA mykobakteriální vnitřní kontroly, jež je amplifikována a detekována spolu se vzorkem.

Činidlo Master Mix obsahuje pár primerů, který se používá k amplifikaci oblasti specifické pro gen chromozomu a specifita pro komplex *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*) je umožněna dvojitě označenou detekční sondou specifickou pro cíl. K amplifikaci vnitřní kontroly DNA slouží stejný pár primerů. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a vnitřní kontrole specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci amplikonu MTB a amplikonu vnitřní kontroly mykobaktérie.

Příprava vzorku

NALC/NaOH¹⁷ zkपालněné, dekontaminované sputum a vzorky BAL se promyjí proplachovacím roztokem pro vzorky z dýchacích cest. Organismy jsou rozpuštěny při inkubaci v rozpouštěcím činidle pro vzorky z dýchacích cest a vzorek se připraví k amplifikaci přidáním neutralizačního činidla pro vzorky z dýchacích cest.

PCR amplifikace

Volba cíle

Genom *mykobakterií* obsahuje vysoce konzervovanou oblast přibližně 1500 nukleotidů, která kóduje gen pro 16S rRNA. Test COBAS® TaqMan® MTB využívá *mykobakteriálnímu* genu specifické primery k vymezení sekvence v rámci této oblasti¹⁸.

Cílová amplifikace

PCR amplifikace probíhá v K-zkumavkách nebo K-zásobnících, ve kterých se připravené vzorky přidávají do amplifikační směsi. Tato reakční směs se zahřeje pro denaturaci dvoušroubovice DNA a tím se odhalí cílové sekvence pro primer. Během ochlazování směsi dochází k anelaci primerů k cílovým sekvencím. Z05 DNA polymeráza za přítomnosti Mg²⁺ a nadbytku deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs) prodlužuje napojené primery podél cílových templátů a vytváří molekulu dvouřetězcové DNA, která se nazývá 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 genomu MTB mezi primery; celý genom MTB amplifikován není.

Amplifikace vnitřní kontroly

Při enzymatických amplifikačních postupech, jakým je PCR, se může účinnost snižovat v důsledku přítomnosti inhibitorů v klinickém vzorku. Připravené vzorky, které obsahují látky, jež by mohly PCR amplifikaci rušit, je možno identifikovat pomocí vnitřní kontroly. Mykobakteriální vnitřní kontrola je neinfekční rekombinantní linearizovaná plazmidová DNA se stejnými oblastmi vázajícími primer jako v cílové sekvenci *M. tuberculosis* a s randomizovanou interní sekvencí podobné délky a složení bází jako u cílové sekvence *M. tuberculosis* a s jedinečnou oblastí vázající sondy, kterou se amplikon vnitřní kontroly mykobaktérie odlišuje od cílového amplikonu. Tyto vlastnosti jsou vybrány proto, aby se zajistila ekvivalentní amplifikace jak mykobakteriální vnitřní kontroly, tak cílové DNA *M. tuberculosis*. Test COBAS® TaqMan® MTB obsahuje činidlo vnitřní kontroly mykobaktérie a to se zavádí do každé amplifikační reakce, kde se amplifikuje společně s DNA MTB z klinického vzorku. Mykobakteriální vnitřní kontrola slouží k identifikaci vzorků, které obsahují inhibitory rušící amplifikaci a detekci cílové sekvence MTB.

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny z klinického vzorku se dosahuje v testu COBAS® TaqMan® MTB použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy)¹⁹ a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, ale nikoliv DNA obsahující thymidin. 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 Mixu hořčíkem 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 cykličačním kroku při alkalickém pH směsi činidla Master Mix 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® MTB využívá v reálném čase běžící PCR technologii. Použití dvojité značených fluorescenčních sond umožňuje detekci akumulace PCR produktů v reálném čase monitorováním intenzity emise fluorescenčního barviva uvolněného během amplifikačního procesu. SONDY se skládají z oligonukleotidů specifických pro MTB a vnitřní kontrolu mykobaktérie značených oznamovacím a tlumícím barvivem. V testu COBAS® TaqMan® MTB jsou sondy MTB a sondy vnitřní kontroly mykobaktérie značeny různými fluorescenčními oznamovacími barvivy. Jsou-li tyto dvojité fluorescenčně značené sondy intaktní, je fluorescence oznamovacího barviva potlačena blízkostí tlumícího barviva kvůli přenosovému vlivu energie Försterova typu. Při PCR hybridizuje sonda s cílovou sekvencí a je rozštěpena 5' na 3' exonukleázovou aktivitu termostabilní Z05 DNA polymerázy. Jakmile je oznamovací a tlumící barvivo uvolněno a odděleno, nedochází nadále k útlumu a fluorescenční aktivita oznamovacího barviva se zvýší. Amplifikace DNA MTB a DNA mykobakteriální vnitřní kontroly je měřena nezávisle při různých vlnových délkách. Tento proces je opakován po předem určený počet cyklů, přičemž každý cyklus efektivně zvyšuje emisní intenzitu jednotlivého oznamovacího barviva a umožňuje nezávislou identifikaci DNA MTB a DNA vnitřní kontroly mykobaktérie.

ČINIDLA

AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation Kit

RSP PREP

100 testů

Souprava pro přípravu vzorků z dýchacích cest AMPLICOR®

(P/N: 20756903 122; ART: 07 5690 3; US: 83267)

RW

2 x 25 ml

(Promývací roztok pro vzorky z dýchacích cest)

Pufr Tris-HCl

< 1 % rozpouštědlo

EDTA

0,05 % azid sodný

RL

3 x 6 ml

(Rozpouštěcí činidlo pro vzorky z dýchacích cest)

0,2 % hydroxid sodný

< 1 % rozpouštědlo

EDTA

0,05 % azid sodný

RN

2 x 5 ml

(Neutralizační činidlo pro vzorky z dýchacích cest)

Pufr Tris-HCl

Chlorid hořečnatý

0,05 % azid sodný

COBAS® TaqMan® MTB Test

CTM MTB

48 testů

(P/N: 04803531 190)

Kontrolní činidla

MYCO IC

4 x 0,1 ml

(Mykobakteriální vnitřní kontrola)

Pufr Tris-HCl

< 0,001 % neinfekční (mikrobiální) DNA plazmid s obsahem

primeru vázajícího mykobakteriální sekvence a specifickou oblast pro vazbu sondy

< 0,005 % Poly rA RNA (syntetická)

EDTA

Amarantové barvivo

0,05 % azid sodný

MTB (+) C

1 x 0,75 ml

[Pozitivní kontrola *M. tuberculosis*]

Pufr Tris-HCl

< 0,001 % neinfekční (mikrobiální) DNA plazmid s obsahem

MTB sekvencí

< 0,005 % Poly rA RNA (syntetická)

EDTA

0,05 % azid sodný

MYCO (-) C

1 x 0,75 ml

[Mykobakteriální negativní kontrola]

Pufr Tris-HCl

< 0,005 % Poly rA RNA (syntetická)

EDTA

0,05 % azid sodný

Amplifikační a detekční činidla

MTB MMX

(COBAS® TaqMan® MTB Master Mix)

4 x 12 testů

Tricinový pufr

4 x 0,46 ml

Octan draselný

Hydroxid draselný

Dimethyl sulfoxid

Glycerol

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

< 0,001 % MTB primery

< 0,001 % fluorescenčně značené oligonukleotidové sondy specifické pro MTB a mykobakteriální vnitřní kontrolu

< 0,001 % oligonukleotidový aptamer

< 0,05 % Z05 DNA polymeráza (mikrobiální)

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

0,09 % azid sodný

MYCO Mg²⁺

(Mykobakteriální hořčikové činidlo)

4 x 12 testů

< 1,0 % octan hořečnatý

4 x 0,2 ml

0,09 % azid sodný

VAROVÁNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

A. PRO ÚČELY DIAGNOSTIKY *IN VITRO*.

- B. Tento test je určen pouze k vyšetření sputa nebo BAL, které bylo zkapalněno, dekontaminováno a koncentrováno pomocí metod NALC-NaOH¹⁷.
- C. Nepipetujte ústy.
- D. V pracovních laboratorních prostorách nejíst, nepít a nekouřit. Při manipulaci se vzorky a s činidly ze soupravy noste ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a prostředky pro ochranu očí. Po práci se vzorky a činidly si důkladně umyjte ruce.
- E. Při odebrání alikvotních podílů z lahvíček s činidly dbejte na to, aby nedošlo k mikrobiální kontaminaci.
- F. Doporučuje se používat jednorázových pipet a hrotů k pipetám.
- G. Nesměšujte dohromady činidla z různých šarží, ani z různých lahvíček téže šarže.
- H. Nesměšujte dohromady činidla z různých souprav.
- I. Nespotřebovaná činidla, odpad a vzorky likvidujte v souladu s celostátními a místními předpisy.
- J. Po uplynutí doby použitelnosti již soupravu nepoužívejte.
- K. Bezpečnostní listy pro materiály (MSDS) zašle na vyžádání Vaše místní pobočka společnosti Roche.
- L. 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*²⁰ a v dokumentu CLSI č. M29-A3²¹. Všechny plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,5% roztokem chlornanu sodného v deionizované nebo destilované vodě.

POZN.: *Běžné bělicí prostředky pro domácnost obvykle obsahují chlornan sodný v koncentraci 5,25 %. Roztok o koncentraci 0,5 % tedy získáme zředěním bělidla pro domácnost v poměru 1:10.*

- M. **RW, RL, RN, MTB MMX, MYCO Mg²⁺, MYCO IC, MTB (+) C a MYCO (-) C** 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.
- N. 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.**
- O. Při práci s jakýmkoliv 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.

- P. Jestliže po amplifikaci dojde k otevření K-zkumavky nebo K-zásobníku, ponechte na K-nosič, jamky a vyliťou kapalinu působit přes noc bělicí prostředek (účinná koncentrace je 5000 ppm; 0,5%), aby došlo ke zničení uvolněného amplikonu.

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

Činidla ani kontroly nezmrazujte.

- A. Skladujte **RW**, **RL** a **RN** při 2-25 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena.
- B. Skladujte **MTB MMX**, **MYCO Mg²⁺**, **MYCO IC**, **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** při 2-8 °C. Pokud nejsou tato činidla otevřená, jsou stabilní až do uplynutí doby použitelnosti, která je na nich uvedena.
- C. Částečně spotřebované **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** uchovávejte mezi jednotlivými testy při teplotě 2-8 °C. Před použitím zkontrolujte datum použitelnosti otevřených kontrol. **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** lze použít až čtyřikrát. Po otevření je možné jakoukoliv **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** uchovávat po dobu až 4 týdnů nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.
- D. **MTB MMX**, **MYCO Mg²⁺** a **MYCO IC** se dodávají v jednorázových lékovkách pro 12 reakcí. Veškerý nespotebovaný materiál je nutné zlikvidovat.
- E. Pracovní roztok Master Mixu (připravený přidáním **MYCO Mg²⁺** a **MYCO IC** do **MTB MMX**) lze uchovávat ve tmě při 2-8 °C až 2 hodiny.
- F. Připravené vzorky a kontroly se musí přidat do Master Mixu do 2 hodin od přípravy, pokud je uchováván při pokojové teplotě nebo do 8 hodin, pokud je uchováván při teplotě 2-8 °C.
- G. S amplifikací je třeba začít do 90 minut od okamžiku, kdy byly zpracované vzorky a kontroly odměřeny do pracovního Master Mixu.

DODÁVANÉ MATERIÁLY

Činidla pro přípravu vzorku

- A. **AMPLICOR® Respiratory Specimen Preparation Kit**
Souprava pro přípravu vzorků z dýchacích cest AMPLICOR®
(P/N: 20756903 122; ART: 07 5690 3; US: 83267)

RSP PREP

RW

(Promývací roztok pro vzorky z dýchacích cest)

RL

(Rozpouštěcí činidlo pro vzorky z dýchacích cest)

RN

(Neutralizační činidlo pro vzorky z dýchacích cest)

Amplifikační a detekční činidla

- B. **COBAS® TaqMan® MTB Test**
(P/N: 04803531 190)

CTM MTB

MYCO IC

(Mykobakteriální vnitřní kontrola)

MTB (+) C

[Pozitivní kontrola *M. tuberculosis*]

MYCO (-) C

[Mykobakteriální negativní kontrola]

MTB MMX

(COBAS® TaqMan® MTB Master Mix)

MYCO Mg²⁺

(Mykobakteriální hořčikové činidlo)

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Vybavení a software

- Analyzátor COBAS® TaqMan® 48
- Software AMPLILINK, verze 3.2 nebo 3.3
- Datová stanice pro software AMPLILINK
- Příručka pro analyzátor COBAS® TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou k softwaru AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3
- Aplikační příručka k softwaru AMPLILINK verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS® TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátořem COBAS® AMPLICOR®

nebo

- Aplikační příručka k 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**
- Zařizování pro manipulaci s víčky K-zkumavek (P/N: 03516539001)
- Uzavírací nástroj K-zásobníků (P/N: 03339904001)
- K-nosič analyzátořu COBAS® TaqMan® 48 (P/N: 28150397001)
- Nosič K-zásobníků analyzátořu COBAS® TaqMan® 48 (P/N: 03341488001)

Spotřební materiál

- K-zkumavky (P/N: 03137082001)
- K-zásobníky analyzátořu COBAS® TaqMan® 48 (P/N: 03343146001)

DALŠÍ POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Vířivý mixér
- Pipetovací pomůcka: Drummond (P/N: 4-000-100) nebo ekvivalentní
- 1,5 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěřem sterilní, nesilikonované, kónické (Sarstedt 72.692.105 nebo ekvivalentní)**
- Stojany na zkumavky (Sarstedt 93.1428 nebo ekvivalentní)
- Pipetory (objem 50 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl, 500 µl a 1000 µl)* se špičkami s aerosolovou bariérou nebo se špičkami s aktivním vypuzováním
- Sterilní přenosové pipety s tenkou špičkou
- Mikrocentrifuga (max. RCF 16 000 x g, min. RCF 12 500 x g); Eppendorf 5415C, HERMLE Z230M nebo ekvivalentní
- 60 °C ± 2 °C termoblok
- Teploměr
- Savý papír
- Rukavice na jedno použití bez prášku
- Skříňka BioSafety s podtlakem

* Pipetory musí být přesné na 3 % jmenovitého objemu. Kde je tak uvedeno, musejí být použity špičky s aerosolovou bariérou nebo špičky s aktivním vypuzováním prosté DNázy (nebo prosté nukleázy), aby se zabránilo vzájemné kontaminaci vzorku a amplikonu.

** Zkumavky se šroubovacím víčkem musí být použity k přípravě vzorků a kontrol, aby se zabránilo jejich vystříknutí a jejich možné vzájemné kontaminaci. **Nepoužívejte zkumavky s nasazovacím uzávěřem.**

ODBĚR, PŘEPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ

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

A. Odběr vzorků

Jedinými vhodnými vzorky z dýchacích cest jsou vykašlané a indukované sputum nebo BAL. Tyto vzorky je potřeba zkapalnit, dekontaminovat a koncentrovat s použitím NALC-NaOH¹⁷ metod.

B. Přepřava vzorků

Dekontaminované vzorky se musí transportovat do laboratoře při teplotě 2-25 °C do 24 hodin po odběru. Pokud se vzorky nepřepřaví do 24 hodin, musí se uchovávat a přepřavovat při teplotě -70 °C. Vzorky musí být odesílány v souladu s celostátními a místními předpisy pro transport etiologických agens²².

C. Uchovávání vzorků

Dekontaminované vzorky lze uchovávat při teplotě -20 °C po dobu 2 týdnů.

NÁVOD K POUŽITÍ

POZN.: *Detailní provozní pokyny, podrobný popis možných konfigurací, tisk výsledků a interpretace příznaků, komentáře a chybová hlášení naleznete (1) v příručce uživatele k analyzátoru COBAS®TaqMan® 48 pro použití s aplikační příručkou pro software AMPLILINK, verze 3.2 a 3.3; (2) v aplikační příručce k softwaru AMPLILINK, verze 3.2 pro použití se zařízením COBAS® AmpliPrep, analyzátořem COBAS®TaqMan®, analyzátořem COBAS® TaqMan® 48 a analyzátořem COBAS®AMPLICOR® nebo v aplikační příručce 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.*

POZN.: *Budou-li vzorky připraveny, amplifikovány a detekovány v průběhu jednoho pracovního dne, postupujte podle níže uvedeného návodu. Je-li příprava vzorku prováděna v jiný den než amplifikace a detekce, pak proveďte přípravu činidla ve stejný den jako amplifikaci a detekci.*

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

POZN.: *Vzorky je třeba nechat roztát (jestliže byly zmrazené), musí být temperovány na okolní teplotu po dobu 15-30 minut a před použitím zamíchány.*

POZN.: *Používejte pipety se špičkami s ochranou proti tvorbě aerosolu nebo aktivním vypuzováním všude, kde je to předepsáno. Věnujte maximální pozornost zabránění kontaminace.*

Množství pro jeden cyklus:

Každá souprava testu COBAS® TaqMan® MTB obsahuje dostatečné množství činidla pro čtyři 12-testové cykly, které mohou probíhat zvlášť nebo současně. Jeden replikát, každý z **MYCO (-) C** a **MTB (+) C**, musí být zahrnut do každého cyklu testu s až 48 vzorky a kontrolami (viz část „Kontrola kvality“). Amplifikační a detekční činidla jsou balena v 12-testových lahvičkách na jedno použití. Pro co nejefektivnější využití je vhodné zpracovávat činidla, vzorky i kontroly v dávkách, jež jsou násobky 12.

A. Příprava vzorku a kontroly

Provádí se v: Preamplifikace - prostor pro přípravu vzorků a kontrol

1. Dle počtu vzorků určených k testování připravte na pracovní plochu příslušný počet polypropylenových šroubovacích zkumavek s objemem 1,5 ml tak, aby byla k dispozici jedna zkumavka pro každý vzorek a jedna zkumavka pro každou kontrolu. **Nepoužívejte zkumavky s nasazovacím uzávěrem.** Dbejte pokynů uvedených v části „Varování a bezpečnostní opatření“. Každou zkumavku na přípravu vzorku označte identifikačním číslem vzorku.
2. Přidejte 500 µl **RW** do každé zkumavky na vzorek.
3. S použitím pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou přidejte do označených zkumavek obsahujících **RW** 100 µl zkapalněného, dekontaminovaného a koncentrovaného vzorku z dýchacích cest. Pro každý vzorek použijte novou špičku s aerosolovou bariérou. Zkumavky uzavřete a nechte 5 sekund vířit.
4. Odstřeďte po dobu 10 minut při 12 500 x g.
5. Odsajte supernatant pomocí přenosové pipety s tenkou špičkou a přidejte 100 µl **RL** do buněčné pelety pomocí pipetoru s novou špičkou s aerosolovou bariérou pro každý vzorek. Vortexujte 5 sekund, aby došlo k resuspendaci sedimentu.
6. Připravte pracovní kontroly dle následujícího návodu:

POZN.: *Pracovní kontroly je nutno připravovat čerstvé každý den, kdy je prováděn test. Na konci dne musí být znehodnoceny.*

POZN.: *MTB (+) C a MYCO (-) C dodávané se soupravou testu COBAS® TaqMan® MTB jsou určeny pro čtyřnásobné použití k přípravě pracovních kontrol MTB (+) a MYCO (-). Po otevření je možné jakoukoliv MTB (+) C a MYCO (-) C uchovávat po dobu až 4 týdnů nebo do doby použitelnosti, dle toho, která je kratší.*

- a. Vortexujte lahvičku s **MYCO (-) C** po dobu 5 sekund. Pipetujte 50 µl **MYCO (-) C** do 1,5 ml polypropylenové zkumavky pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou. Přidejte 200 µl **RL**. Vortexujte 5 sekund. Toto je *Mycobacterium* (-) pracovní kontrola.
- b. Vortexujte lahvičku s **MTB (+) C** po dobu 5 sekund. Pipetujte 50 µl **MTB (+) C** do 1,5 ml polypropylenové zkumavky pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou. Přidejte 200 µl **RL**. Vortexujte 5 sekund. Toto je *M. tuberculosis* (+) pracovní kontrola.

- c. Pipetujte 100 µl z každé pracovní kontroly do 1,5 ml polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem pro přípravu paralelně s klinickými vzorky.
7. Inkubujte vzorky a kontroly za teploty 60 °C ± 2 °C v suchém topném bloku po dobu 45 minut.
8. Vytáhněte zkumavky z topného bloku odstředte v centrifuze po dobu 5 sekund, aby se odstranil kondenzát z oblasti uzávěru.
9. Pomocí pipetoru se špičkou s aerosolovou bariérou přidejte 100 µl **RN** do každé zkumavky se vzorkem a kontrolou. Vortexujte 5 sekund při poloviční rychlosti. Použijte novou špičku s aerosolovou bariérou pro každý vzorek a kontrolu.
10. Přesuňte připravené vzorky (vzorky pacienta a kontroly) do prostoru pro amplifikaci/detekci.

B. Příprava činidla a vložení K-nosiče

Provádí se v: Preamplifikace - prostor pro přípravu činidel

POZN.: Vzorky a kontroly zpracované pomocí činidel COBAS® TaqMan® MTB Master Mix (MTB MMX), "Pracovní Master Mix" (Pracovní MMX) a Pracovní MMX plus jsou citlivé na světlo. Ochraňujte tato činidla před světlem.

POZN.: COBAS® TaqMan® MTB Master Mix (MTB MMX), Mykobakteriální vnitřní kontrola COBAS® TaqMan® (MYCO IC) a Mykobakteriální hořčičkové činidlo COBAS® TaqMan® (MYCO Mg²⁺) musí být temperovány na okolní teplotu po dobu alespoň 30 minut před přípravou pracovního Master Mixu.

POZN.: Připravte pracovní MMX po dokončení manuální přípravy vzorku a kontroly.

POZN.: Připravené vzorky jsou stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě nebo 4 dny při teplotě 2-8 °C před přidáním do pracovního Master Mixu.

POZN.: Pracovní činidlo MMX musí být uchováno při teplotě 2-8 °C a je třeba ho spotřebovat do 2 hodin od přípravy.

POZN.: Připravené vzorky lze skladovat při teplotě -70 °C po dobu 6 měsíců.

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

1. Temperujte na okolní teplotu jednu lahvičku **MTB MMX**, jednu lahvičku **MYCO Mg²⁺** a jednu lahvičku **MYCO IC** po dobu alespoň 30 minut.
2. K-nosič umístěte do držáku K-nosiče.
3. Vložte nové K-zkumavky nebo nový K-zásobník do K-nosiče bez dotyku stran K-zkumavek nebo jamek K-zásobníku.

POZN.: Má-li být provedeno méně než 24 testů, musí být obsazeny pozice jamek 1, 2, 5, 20, 23 a 24 K-zkumavky pro vyvážení K-nosiče v termocyklieru.

4. Otevřete K-zkumavky pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek. Umístěte víčka do parkovací pozice držáku K-zkumavek.
5. Připravte pracovní MMX dle následujícího návodu:

Přidejte 200 µl **MYCO Mg²⁺** a 50 µl **MYCO IC** do jedné lahvičky **MTB MMX**. Zkumavku uzavřete a dobře promíchejte tak, že ji 10-krát převrátíte. Víření k promísení pracovního MMX nepoužívejte. Pracovní Master Mix chraňte před světlem a spotřebujte do 2 hodin.

6. Pipetujte 50 µl pracovního MMX do každé K-zkumavky nebo příslušné jamky K-zásobníku.

POZN.: Pracovní MMX je velmi citlivý na světlo. Minimalizujte vystavení světlu K-zkumavek nebo K-zásobníku s obsahem pracovního MMX.

7. Z každého připraveného vzorku a kontroly odměřte 50 µl do příslušné K-zkumavky nebo K-zásobníku obsahujícího pracovní MMX; použijte k tomu mikropipetor se špičkou s aerosolovou bariérou nebo s aktivním vypuzováním. Jemně promíchejte každý vzorek nebo kontrolu nahoru a dolů třikrát pomocí mikropipetoru, který nevytváří bubliny.
8. Opakujte krok 7 pro každý připravený vzorek a připravenou kontrolu, dokud není 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. Uzavřete K-zkumavky/K-zásobníky pomocí zařízení pro manipulaci s víčky K-zkumavek/K-zásobníků. Vizuálně si ověřte, že byly přidány odpovídající objemy.
9. Jestliže amplifikace okamžitě nezačne, uložte K-nosič připravený pro PCR ve tmě při teplotě 15-30 °C. S amplifikací je nutné začít nejpozději do 90 minut od chvíle, kdy byly připravené vzorky a kontroly přidány do K-zkumavek nebo K-zásobníku obsahujících pracovní MMX.

C. Amplifikace a detekce

Provádí se v: Poamplifikace - prostor pro amplifikaci a detekci

Plnění a provoz analyzátoru COBAS® TaqMan® 48

1. Zapněte pracovní stanici a přihlaste se k Windows XP pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
2. Zapněte analyzátor COBAS® TaqMan® 48 alespoň 30 minut před zahájením analýzy. Zkontrolujte, zda je zařízení zinicizováno a připraveno k použití. Jsou-li K-nosiče z předchozích měření nadále umístěny v některém z termocyklerů, odstraňte je pomocí přemísťovače K-nosičů.
3. Spusťte software AMPLILINK na počítači. Přihlaste se pomocí odpovídajícího uživatelského jména a hesla.
4. Chcete-li vytvořit objednávky K-nosiče pro analyzované vzorky, klepněte na ikonu **Orders**. Vyberte záložku **Sample**, pak klepněte na tlačítko **New** a zadejte číslo objednávky pro každý vzorek pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Zvolte Definici testu pro test COBAS® TaqMan® MTB. Opakujte pro každý vzorek. Klepněte na tlačítko **Save**.

POZN.: Má-li být provedeno méně než 24 testů, musí být obsazeny pozice jamek 1, 2, 5, 20, 23 a 24 K-zkumavky pro vyvážení K-nosiče v termocykleru.

5. Zadejte informace o kontrole kvality výběrem záložky **Quality Control** v okně Orders. Klepněte na tlačítko **New** a pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu zadejte informaci z karty kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® MTB dodávané se soupravou. Do určených polí zadejte číslo šarže testu COBAS® TaqMan® MTB, datum použitelnosti, rozmezí Low (+) kontroly a také kalibrační koeficienty. Klepněte na „**OK**“.
6. Přiřadte číslo K-nosiče k danému měření klepnutím na záložku **K-Carrier** v okně Orders. V okně **K-Carrier** klepněte na **New**. V buňce vpravo od „**K-Carrier ID**“ zadejte číslo K-nosiče z čárového kódu na K-nosiči nebo na K-zásobníku pomocí klávesnice nebo snímače čárového kódu. Vyberte Definici testu pro test COBAS® TaqMan® MTB 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 rolovací nabídky a poté vyberte požadovaný typ kontroly. Poté dvakrát klepněte na pole ID vzorku pro stejnou řadu; zobrazí se okno **Lookup Control** se všemi dostupnými kontrolami. Jakmile je kontrola vybrána, odpovídající kalibrační a kontrolní hodnoty budou zobrazeny v dolním pravém informačním panelu. Opakujte tento proces pro všechny požadované kontroly.
8. Pro zadání vzorků do **Worklist** klepněte dvakrát na první pozici (řadu) pro zadání vzorku. Zobrazí se okno **Lookup Sample**, které obsahuje přiřazené příkazy pro vzorek; pomocí tlačítek **Shift + Šipka** označíte více než jedno číslo příkazu. Zkontrolujte, zda definici testu COBAS® TaqMan® MTB byla přiřazena všechna pořadí.
9. Klepněte na **Save** pro uložení přiřazení objednávky K-nosiče.
10. Vyberte ikonu **Systems** v záložce System a klepněte na **Open** pro otevření termocykleru. Jakmile se kryt termocykleru zcela otevře a objeví se nápis „**Ready to Load**“ v okně **Systems**, zvedněte a přidržte víko termocykleru otevřené. Pomocí přemísťovače K-nosiče přemístěte naplněný K-nosič obsahující uzavřené K-zkumavky s pracovním Master Mixem, vzorky a kontrolami do termocykleru. Zavřete víko termocykleru.
11. Klepněte na **Start** v okně **Systems** pod ikonou TC pro uzavření krytu termocykleru a spuštění cyklu analýzy.
12. Amplifikaci a detekci provede analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky.

VÝSLEDKY

Výpočet výsledků pomocí AMPLILINK, verze 3.2

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje, zda je ve vzorku nebo kontrole detekována DNA MTB. Po uvedení softwaru AMPLILINK, verze 3.3 se v testu MTB v analyzátoru COBAS® TaqMan® používá nová funkce při stanovení kvalitativního výsledku. Prezentace výsledků se mezi verzí softwaru AMPLILINK 3.2 a 3.3 liší.

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro DNA MTB a DNA mykobakteriální vnitřní kontroly (IC).
- Stanovuje, zda je DNA MTB detekována na základě Ct hodnot pro DNA MTB nebo DNA mykobakteriální vnitřní kontroly (MYCO IC DNA).
- Určuje, zda **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** jsou platné.

Validace cyklu pro AMPLILINK, verze 3.2

Zkontrolujte výsledkové okno AMPLILINK nebo výtisk, zda se objevily příznaky a komentáře, abyste se ujistili, že je cyklus testu platný.

Test je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® MTB. Následující výsledky jsou získány pro platný test:

| Kontrola | Výsledek | Interpretace |
|--------------------|---------------------|--------------------------|
| Negativní kontrola | Target Not Detected | Kontrola v rozsahu testu |
| Pozitivní kontrola | 1 Positive | Kontrola v rozsahu testu |

Test není platný, pokud se u kontrol COBAS® TaqMan® MTB objeví některé z následujících příznaků:

MYCO negativní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|---------------|----------|---|
| _N_NC_INVALID | Invalid | Kontaminace nebo žádný signál vnitřní kontroly (IC) |

MTB pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|----------------|----------|---|
| _L_LPC_INVALID | Invalid | Kontrola není v rozsahu testu, nebyl detekován cílový signál ani signál IC. POZN.: MTB PC se označuje jako níže pozitivní kontrola (LPC) |

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

Interpretace výsledků:

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

- Platný test může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků v závislosti na tom, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky a/nebo poznámky.

Výsledky vzorků se interpretují takto:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|---------------------------------------|---------------------|---|
| Žádný příznak | Target Not Detected | DNA <i>M. tuberculosis</i> nebyla detekována. Vzorek je pravděpodobně negativní na <i>M. tuberculosis</i> . Negativní výsledek nevylučuje infekci <i>M. tuberculosis</i> , protože výsledky závisí na adekvátním odběru vzorku, absenci inhibitorů a dostatečném množství detekované DNA. |
| Žádný příznak | 1 Positive | DNA <i>M. tuberculosis</i> byla detekována. Vzorek je pozitivní na přítomnost <i>M. tuberculosis</i> . |
| _Q_RFITOOLOW nebo Žádný příznak | > 1 Positive | DNA <i>M. tuberculosis</i> byla detekována. Vzorek je pozitivní na přítomnost <i>M. tuberculosis</i> . |
| _Q_QS_INVALID | Invalid | Inhibiční vzorek. DNA <i>M. tuberculosis</i> , v případě výskytu, by byla nezjistitelná. Zpracujte další alikvotní podíl původního vzorku a test opakujte. Inhibitory jsou často labilní a vzorky, které byly původně inhibované, již při opakování inhibované být nemusejí. Jestliže již původní vzorek není k dispozici, zpracujte vzorek nový. Pozn.: Software AMPLILINK označí selhání vnitřní kontroly (IC) jako neplatné QS (_Q_QS_INVALID) |

Výpočet výsledků pomocí AMPLILINK, verze 3.3

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48 automaticky stanovuje, zda je ve vzorku nebo kontrole detekována DNA MTB. Po uvedení softwaru AMPLILINK, verze 3.3 se v testu MTB v analyzátoru COBAS® TaqMan® používá nová funkce při stanovení kvalitativního výsledku. Prezentace výsledků se mezi verzí softwaru AMPLILINK 3.3 a 3.2 liší.

Analyzátor COBAS® TaqMan® 48:

- Stanovuje prahovou hodnotu cyklu (Ct) pro DNA MTB a DNA mykobakteriální vnitřní kontroly (IC).
- Stanovuje, zda je DNA MTB detekována na základě Ct hodnot pro DNA MTB nebo DNA mykobakteriální vnitřní kontroly (MYCO IC DNA).
- Určuje, zda **MTB (+) C** a **MYCO (-) C** jsou platné.

Validace cyklu pro AMPLILINK, verze 3.3

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

Test je platný, pokud se neobjeví žádné příznaky pro kontroly COBAS® TaqMan® MTB. Následující výsledky jsou získány pro platný test:

| Kontrola | Výsledek | Interpretace |
|--------------------|----------|--------------------------|
| Negativní kontrola | Negative | Kontrola v rozsahu testu |
| Pozitivní kontrola | Positive | Kontrola v rozsahu testu |

Test není platný, pokud se u kontrol COBAS® TaqMan® MTB objeví některé z následujících příznaků:

MYCO negativní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|------------|----------|--|
| NC_INVALID | Invalid | Žádný signál vnitřní kontroly nebo signál vnitřní kontroly mimo rozsah |

MTB pozitivní kontrola:

| Příznak | Výsledek | Interpretace |
|------------|----------|---|
| PC_INVALID | Invalid | Kontrola není v rozsahu testu, žádný signál cíle nebo žádný signál vnitřní kontroly |

Jestliže bude jakákoli kontrola neplatná, budou všechny vzorky v daném testu označeny jako INVALID. Celý cyklus zopakujte včetně přípravy vzorků a kontrol, amplifikace a detekce.

Interpretace výsledků:

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

- Platný cyklus může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků v závislosti na tom, zda se u jednotlivých vzorků objeví příznaky a/nebo poznámky.

Výsledky vzorků se interpretují takto:

| Výsledky kontrol | Výsledky vzorků | Poznámky u příznaků | Interpretace |
|----------------------------------|-----------------|------------------------------------|---|
| Neplatný | Invalid | PC_INVALID a/nebo NC_INVALID | Kontrola(y) nejsou platné, všechny vzorky obsažené v cyklu vyhodnoceny jako neplatné. |
| Pozitivní u PC Negativní u NC | (–) | Žádný příznak | DNA <i>M. tuberculosis</i> nebyla detekována. Vzorek je pravděpodobně negativní na přítomnost <i>M. tuberculosis</i> . Negativní výsledek ovšem infekci bakterií <i>M. tuberculosis</i> nevylučuje, protože správný výsledek je odvislý od správného odběru vzorku, nepřítomnosti inhibitorů a dostatečného množství DNA pro detekci. |
| Pozitivní u PC Negativní u NC | MTB | Žádný příznak | DNA <i>M. tuberculosis</i> byla detekována. Vzorek je pozitivní na <i>M. tuberculosis</i> . |
| Pozitivní u PC Negativní u NC | Invalid | S_INVALID | Výsledek vzorku je neplatný. Kliknutím na poznámku příznaku zobrazíte podrobné příznaky. ⁽¹⁾ |
| Pozitivní u PC Negativní u NC | Invalid | QS_INVALID | Signál vnitřní kontroly je nezvykle vysoký, vzorek je označen jako neplatný. Zpracujte další podíl původního vzorku a test zopakujte. Pokud již není původní vzorek k dispozici, je třeba odebrat nový. <u>Poznámka:</u> Software AMPLILINK, verze 3.3 označí selhání vnitřní kontroly (IC) kvůli vysokému Ct vnitřní kontroly jako neplatné QS (_Q_QS_INVALID). |

(1) Další informace o poznámkách k příznakům a podrobnosti k příznakům viz kapitola „Příznaky“ v aplikační příručce k 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**.

KONTROLA KVALITY

Jeden replikát MYCO (–) kontroly a MTB kontroly (+) musí být zahrnut do každého běhu. 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 značky a poznámky a zda byl cyklus platný.

Negativní kontrola

MYCO (–) C musí vést k výsledku „**Target Not Detected**“ (při použití softwaru AMPLILINK, v3.2), nebo „**Negative**“ (při použití softwaru AMPLILINK, v3.3), tzn. Ct hodnota pro DNA MTB byla nad hranici analýzy nebo žádná Ct hodnota pro DNA MTB nebyla získána, ale platná Ct hodnota byla získána pro DNA mykobakteriální vnitřní kontroly. Pokud **MYCO (–) C** toto kritérium nespĺňuje, je celý běh neplatný. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Pokud je **MYCO (–) C** trvale neplatná, kontaktujte vaše místní zastoupení Roche pro technickou pomoc.

Pozitivní kontrola

Pro software AMPLILINK, verze 3.2 je přiřazené rozmezí pro **MTB (+) C** dodáváno na kartě kontrolních hodnot testu **COBAS® TaqMan® MTB**. Aby byl výsledek stanovení platný, musí výsledek **MTB (+) C** spadat do rozmezí uvedeného na **kartě kontrolních hodnot testu COBAS® TaqMan® MTB**. Správný výsledek bude zobrazen jako „1 Positive“. Jestliže pozitivní kontrola nespĺňuje toto kritérium, je celý běh neplatný. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže je výsledek pro pozitivní kontrolu trvale mimo přiřazené rozmezí, kontaktujte vaše místní zastoupení Roche pro technickou pomoc.

Pro software AMPLILINK, verze 3.3 je přiřazené rozmezí pro **MTB (+) C** nastaveno v **definičním souboru testu** pro test **COBAS® TaqMan® MTB**. Aby byly výsledky platné, musí hodnoty **MTB (+) C** spadat do daného rozmezí. Správný výsledek bude zobrazen jako „**Positive**“. Jestliže výsledek **MTB (+) C** bude mimo dané rozmezí, výsledek pozitivní kontroly bude **neplatný** s poznámkou příznaku **PC_INVALID**. Jestliže pozitivní kontrola nespĺňuje toto kritérium, je celý cyklus neplatný. Celý postup zopakujte (příprava vzorků a kontrol, amplifikace a detekce). Jestliže je výsledek pro pozitivní kontrolu trvale mimo dané rozmezí, kontaktujte místní zastoupení společnosti Roche, které vám poskytne technickou pomoc.

Kontrola MTB (+) obsahuje přibližně 20 kopií/testů sekvence DNA plazmidu *M. tuberculosis*. To je zhruba čtyřnásobek minimální detekční úrovně tohoto testu zjištěné Poissonovou analýzou. Amplifikace a detekce kontroly MTB (+) jsou zárukou, že amplifikace proběhla. Kontrola MTB (+) 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.

PROCEDURÁLNÍ OMEZENÍ

1. Tento test je určen pouze k vyšetření vzorků vykašlaného a indukovaného sputa nebo BAL, které byly zkapalněny, dekontaminovány a koncentrovány pomocí metod NALC-NaOH. Testování jiných typů vzorků může způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
2. Detekce *M. tuberculosis* je závislá na počtu mikroorganismů nacházejících se ve vzorku. Tento počet může být ovlivněn metodou odběru vzorku, vlastnostmi pacienta (např. jeho věkem či příznaky onemocnění), případně stádiem infekce *M. tuberculosis*.
3. V důsledku inhibice polymerázy mohou být výsledky falešně negativní. K testu COBAS® TaqMan® MTB byla zařazena mykobakteriální vnitřní kontrola umožňující identifikaci zpracovaných vzorků obsahujících substance, které mohou interferovat s PCR amplifikací o více než 20 kopiích/testech.
4. K falešně negativním výsledkům může dojít díky přítomnosti mykobakteriálních druhů o vysokém titru jiného komplexu než *M. tuberculosis* (MTB), za předpokladu, že MTB je přítomna v nižším titru, než interferující mykobakteriální druhy.
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® MTB interpretovat s uvážením všech klinických zjištění a laboratorních nálezů.
9. Se soupravou by měli pracovat pouze pracovníci vyškolení v používání technik PCR.
10. Test COBAS® TaqMan® MTB poskytuje kvalitativní výsledky. Mezi velikostí hodnoty ohybu pozitivního testu COBAS® TaqMan® MTB a počtem buněk *M. tuberculosis* v infikovaném vzorku nelze hledat žádnou korelaci.
11. Tento produkt se může používat pouze ve spojení s analyzátozem COBAS® TaqMan® 48.
12. Přítomnost inhibitorů PCR může vyvolávat falešně negativní nebo neplatné výsledky.
13. I když vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech bakteriálního genomu pokryté primery testu a/nebo sondou, mohou vést k selhání detekce bakterie.
14. Díky samotným rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před změnou technologie na jinou provedli korelační metodické studie ve vlastní laboratoři a stanovili rozdíly mezi technologiemi.

HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ

Analytická specifická

Analytická specifická testu COBAS® TaqMan® MTB byla hodnocena analýzou různých bakterií, virů a plísňů, z nichž mnohé patří k normální flóře nebo jsou obvyklými patogeny dýchací soustavy. Reaktivitu v testu COBAS® TaqMan® MTB nevykazoval žádný z následujících organismů ani virů:

Mykobakteriální druhy

Mycobacterium abscessus
Mycobacterium asiaticum
Mycobacterium avium
Mycobacterium chelonae
Mycobacterium chitae
Mycobacterium fallax
Mycobacterium flavescens
Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium gastri
Mycobacterium gordonae
Mycobacterium intracellulare
Mycobacterium kansasii
Mycobacterium komassense
Mycobacterium malmoense
Mycobacterium marinum

Mycobacterium neoaurum
Mycobacterium nonchromogenicum
Mycobacterium phlei
Mycobacterium scrofulaceum
Mycobacterium senegalens
Mycobacterium shimoidei
Mycobacterium simiae
Mycobacterium smegmatis
Mycobacterium sphagni
Mycobacterium szulgai
Mycobacterium terrii
Mycobacterium thermoresistibile
Mycobacterium triviale
Mycobacterium vaccae
Mycobacterium xenopi

Nemykobakteriální druhy

Acinetobacter calcoaceticus
Actinomyces madurae
Actinomyces pyogenes
Actinoplanes italicus
Aeromonas hydrophila
Arthrobacter oxydans
Bacillus subtilis
Bacteriodes fragilis
Blastomyces dermatitidis
Bordetella parapertussis
Bordetella pertussis
Branhamella (Moraxella) catarrhalis
Brevibacterium linens
Campylobacter jejuni
Candida albicans
Chlamydia trachomatis
Chromobacterium violaceum
Citrobacter freundii
Clostridium perfringens
Coccidioides immitis
Corynebacterium aquaticum
Corynebacterium diphtheriae
Corynebacterium flavescens
Corynebacterium glutamicum
Corynebacterium jeikeium
Corynebacterium minutissimum
Corynebacterium pseudodiphtheriticum
Corynebacterium pseudotuberculosis
Corynebacterium renale
Corynebacterium striatum
Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis
Nocardia farcinica (W5218)
Nocardia nova (W5194)
Nocardia otitidiscaviarum
Nocardia transvalensi
Oerskovia turbata
Parainfluenza virus 2
Peptococcus niger

Corynebacterium xerosis
Cryptococcus neoformans
Deinococcus radiodurans
Dermatophilus congolensis
Derxia gummosa
Eikenella corrodens
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Escherichia coli
Fusobacterium nucleatum
Gordona sputi
Haemophilus influenzae
Herpes simplex virus typ 1
Histoplasma capsulatum
Klebsiella pneumoniae
Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae
Lactobacillus casei
Legionella micdadei
Legionella pneumophila
Lidský adenovirus
Lidský cytomegalovirus
Lidský enterovirus
Lidský rhinovirus 14
Mycoplasma hominis
Mycoplasma pneumoniae
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria lactamica
Neisseria meningitidis
Rhodococcus aichiensis
Rhodococcus chubuensis
Rhodococcus equi
Salmonellacholeraesuis subsp. Choleraesuis
Serratia marcescens
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus gordonii

Peptostreptococcus anaerobius
Peptostreptococcus magnus
Porphyromonas asaccharolytica
Porphyromonas gingivalis
Prevotella melaninogenica
Propionibacterium acnes
Proteus mirabilis
Pseudomonas aeruginosa
 Respirační syncytiální virus

Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Streptomyces griseinus
Veillonella atypica
Veillonella parvula
Vibrio parahaemolyticus
 Virus chřipky B
Xanthomonas maltophilia
Yersinia enterocolitica

Analytická senzitivita: Buňky *M. tuberculosis*

Detekční hranice testu COBAS® TaqMan® MTB byly určeny pomocí stanovení nejmenšího počtu kolonie tvořící jednotky (CFU) *M. tuberculosis*, kterou lze reprodukovatelně detekovat ($\geq 95\%$ pozitivních výsledků) pomocí testu COBAS® TaqMan® MTB. Dekontaminovaná kultura MTB byla rozředěna do NALC/NaOH zkapalněného negativního sputa a byl vytvořen panel se 7 úrovněmi koncentrace obsahujícími 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 a 0 MTB CFU/PCR. Tento panel byl připravován samostatně každý den po dobu tří dnů. Pomocí tří šarží činidel testu COBAS® TaqMan® MTB bylo testováno padesát čtyři replikátů každé úrovně panelu. Výsledky analýzy Probit (tabulka 1) ukazují detekční hranici testu COBAS® TaqMan® MTB, která je u vzorků sputa 0,46 CFU/PCR nebo přibližně 18 CFU/ml.

Tabulka 1
Detekční hranice testu COBAS® TaqMan® MTB u buněk *M. tuberculosis*

| Člen panelu | Nominální vstup CFU/PCR | Počet neplatných | Počet platných | Počet pozitivních | Počet studií | % detekce | 95 % CI |
|-------------|-------------------------|------------------|----------------|-------------------|--------------|-----------|-------------|
| 1 | 10 | 0 | 54 | 54 | 54 | 100,0 % | 94,6-100 % |
| 2 | 5 | 0 | 54 | 54 | 54 | 100,0 % | 94,6-100 % |
| 3 | 1 | 0 | 54 | 54 | 54 | 100,0 % | 94,6-100 % |
| 4 | 0,5 | 0 | 54 | 51 | 54 | 94,4 % | 84,6-98,8 % |
| 5 | 0,25 | 0 | 54 | 46 | 54 | 85,2 % | 72,9-93,4 % |
| 6 | 0,1 | 0 | 54 | 33 | 54 | 61,1 % | 46,9-74,0 % |
| 7 | 0 | 0 | 54 | 0 | 54 | 0,0 % | 0,0-5,4 % |

95 % LOD podle PROBIT = **0,46 CFU/PCR**

95 % interval spolehlivosti = 0,33 - 0,83 CFU/PCR

Inkluzivita

Test COBAS® TaqMan® MTB byl vyhodnocen se všemi druhy mykobaktérie nalezené v komplexu MTB (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* a *M. africanum*). Byly vyhodnoceny přípravky kvantifikované genomické DNA (10 kopií/PCR) a bakteriální struktury. Na vstupní hladině 10 genomických kopií/PCR byli všichni 4 členové MTB komplexu vyhodnoceni jako pozitivní. Dále bylo testem COBAS® TaqMan® MTB vyhodnoceno 169 kultur druhů MTB komplexů (*M. tuberculosis* = 159, *M. bovis* = 6, *M. microti* = 3 a *M. africanum* = 1). Jedna kultura *M. microti* a jedna kultura *M. tuberculosis* byla vyhodnocena jako negativní, tj. celková míra inkluзивity byla 99 %.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu COBAS® TaqMan® MTB byla vyhodnocena pomocí výsledků analýzy mezi jednotlivými dny, mezi šaržemi a mezi obsluhami. Studie mezi jednotlivými dny (tabulka 2) byla provedena jedním pracovníkem s jednou šarží činidla COBAS® TaqMan® MTB po dobu 15 dní pomocí MYCO negativní kontroly (NC), MTB pozitivní kontroly (PC) a MTB pozitivní kontroly zředěné negativní kontrolou (1/2 PC). Studie mezi šaržemi (tabulka 3) byla provedena jedním pracovníkem v jednom dni se třemi šaržemi činidel COBAS® TaqMan® MTB pomocí MYCO negativní kontroly (NC), MTB pozitivní kontroly (PC) a MTB pozitivní kontroly zředěné negativní kontrolou (1/4 PC a 1/2 PC). Studie mezi obsluhami (tabulka 4) byla provedena třemi obsluhami během tří dnů s jednou šarží činidla COBAS® TaqMan® MTB pomocí MYCO negativní kontroly (NC), MTB pozitivní kontroly (PC) a MTB pozitivní kontroly zředěné negativní kontrolou (1/2 PC).

720 výsledků těchto tří studií je shrnuto v tabulkách 2-4. Negativní výsledky byly získány ve 100 % ze 132 testovaných NC replikátů. Všechny 588 pozitivních replikátů, v rozsahu od 20 do 5 kopií cílové MTB/PCR, bylo vyhodnoceno jako pozitivní. Ze všech tří studií byl celkový variační koeficient %CV 2,4 nebo méně, což ukazuje dobrou reprodukovatelnost kvalitativních výsledků s tímto testem.

Tabulka 2
Reprodukovatelnost mezi jednotlivými dny testu COBAS® TaqMan® MTB

| Cílová MTB | NC (0 c/PCR) | PC (~20 c/PCR) | 1/2 PC (~10 c/PCR) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Celkový počet platných replikátů | 60 | 60 | 60 |
| % pozitivních výsledků | 0 % | 100 % | 100 % |
| Průměrný ohyb MTB | Není k dispozici | 39,4 | 41,1 |
| Minimální hodnota | Není k dispozici | 38,3 | 39,9 |
| Maximální hodnota | Není k dispozici | 40,8 | 42,8 |
| Směrodat. odchylka | Není k dispozici | 0,5 | 0,7 |
| Variační koeficient | Není k dispozici | 1,3 % | 1,7 % |

Tabulka 3
Reprodukovatelnost mezi šaržemi testu COBAS® TaqMan® MTB

| Cílová MTB | NC (0 c/PCR) | PC (~20 c/PCR) | 1/2 PC (~10 c/PCR) | 1/4 PC (~5 c/PCR) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Celkový počet platných replikátů | 36 | 36 | 36 | 324 |
| % pozitivních výsledků | 0 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| Průměrná MTB ohybu | Není k dispozici | 39,6 | 40,7 | 41,6 |
| Minimální hodnota | Není k dispozici | 38,5 | 39,1 | 39,5 |
| Maximální hodnota | Není k dispozici | 41,3 | 42,3 | 48,0 |
| Směrod. odchylka | Není k dispozici | 0,8 | 0,7 | 1,0 |
| Variační koeficient | Není k dispozici | 1,9 % | 1,7 % | 2,4 % |

Tabulka 4
Reprodukovatelnost mezi obsluhami testu COBAS® TaqMan® MTB

| Cílová MTB | NC (0 c/PCR) | PC (~20 c/PCR) | 1/2 PC (~10 c/PCR) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Celkový počet platných replikátů | 36 | 36 | 36 |
| % pozitivních výsledků | 0 % | 100 % | 100 % |
| Průměrná MTB ohybu | Není k dispozici | 39,6 | 40,8 |
| Minimální hodnota | Není k dispozici | 38,4 | 39,2 |
| Maximální hodnota | Není k dispozici | 41,5 | 42,6 |
| Směrod. odchylka | Není k dispozici | 0,8 | 0,8 |
| Variační koeficient | Není k dispozici | 1,9 % | 2,0 % |

Korelace

Studie korelace byla provedena kvůli srovnání účinnosti testu COBAS® TaqMan® MTB a testu COBAS® AMPLICOR® MTB. Ve studii bylo analyzováno celkem 769 vzorků sputa a 186 vzorků bronchoalveolárních laváží (BAL). Vzorky byly získány buď ze zmrazených archívů, nebo byly čerstvě odebrané a zmrazené. Ve studii byly použity tři jedinečné šarže činidel testu COBAS® TaqMan® MTB.

Korelační míra pozitivních vzorků sputa (tabulka 5) byla 96,2 % a korelační míra negativních vzorků byla 99,1 %; celková shoda vzorků sputa mezi testem COBAS® TaqMan® MTB a testem COBAS® AMPLICOR® MTB byla 98,3 %. Korelační míra pozitivních vzorků BAL (tabulka 6) byla 97,1 % a korelační míra negativních vzorků byla 99,3 %; celková shoda vzorků BAL mezi testem COBAS® TaqMan® MTB a testem COBAS® AMPLICOR® MTB byla 98,9 %.

Tabulka 5
Celková korelace výsledků sputa mezi testy COBAS® TaqMan® MTB a COBAS® AMPLICOR® MTB Test

| Výsledky sputa N = 769 | | Test COBAS® AMPLICOR® MTB | | Celkem |
|----------------------------|---|------------------------------|-----|--------|
| | | + | - | |
| Test COBAS® TaqMan® MTB | + | 207 | 5 | 212 |
| | - | 8 | 549 | 557 |
| Celkem | | 215 | 554 | 769 |

| | Poměr | % shody | 95% interval spolehlivosti |
|------------------------------------|---------|---------|-------------------------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků | 207/215 | 96,2 % | 92,8-98,4 |
| Procentní shoda negativních vzorků | 549/554 | 99,1 % | 97,9-99,7 |
| Celková shoda | 756/769 | 98,3 % | 97,1-99,1 |

Tabulka 6
Celková korelace výsledků BAL mezi testy COBAS® TaqMan® MTB
a COBAS® AMPLICOR® MTB Test

| Výsledky BAL N = 186 | | Test COBAS® AMPLICOR® MTB | | Celkem |
|----------------------------|---|------------------------------|-----|--------|
| | | + | - | |
| Test COBAS® TaqMan® MTB | + | 34 | 1 | 35 |
| | - | 1 | 150 | 151 |
| Celkem | | 35 | 151 | 186 |

| | Poměr | % shody | 95% interval spolehlivosti |
|---------------------------------------|---------|---------|-------------------------------|
| Procentní shoda pozitivních vzorků | 34/35 | 97,1 % | 85,1-99,9 |
| Procentní shoda negativních vzorků | 150/151 | 99,3 % | 96,4-99,9 |
| Celková shoda | 184/186 | 98,9 % | 98,9-99,9 |

Selhání celého systému

Míra selhání celého systému byla pro test COBAS® TaqMan® MTB stanovena pomocí analýzy procenta pozitivních výsledků se 100 replikáty negativního sputa, které byly naočkovány MTB kulturou až do konečné koncentrace 60 CFU/ml nebo ~3-krát detekční hranice testu (viz část Detekční hranice výše). Pozitivního výsledku bylo dosaženo u 99 ze 100 replikátů, což znamená míru selhání celého systému 1,0 % a míru úspěšnosti systému 99 % pro test COBAS® TaqMan® MTB.

Interference

Test COBAS® TaqMan® MTB byl vyhodnocen na interferenci s endogenním hemoglobinem pomocí testování negativního sputa nastříknutého MTB pozitivní kontrolou (25 kopií/PCR) a hemoglobinem od 0,52 do 5,2 mg/ml. U testu COBAS® TaqMan® MTB nebyla zjištěna interference při žádné hladině nastříknutého hemoglobinu.

Test COBAS® TaqMan® MTB byl vyhodnocen na interferenci se šesti léky na tuberkulózu, které se běžně používají při léčbě. Těchto šest léků (tabulka 7) bylo testováno při 1 x C_{Max} a 3 x C_{Max} nastříknutím léků do negativního sputa obsahujícího plazmid MTB pozitivní kontroly (~17 kopií/PCR). Na účinnost testu COBAS® TaqMan® MTB neměl vliv ani jeden z šesti léků nastříknutých v hladinách 1 x C_{Max} a 3 x C_{Max}.

Tabulka 7
Léky proti tuberkulóze a hladiny C_{Max}

| Léčivo | Generický název | Zkratka | C _{Max} (µg/ml) |
|---------------------|---------------------------------|------------|-----------------------------|
| Izoniazid | Hydrazid kyseliny izonikotinové | INH | 5 - 7 |
| Ethambutol | Ethambutol dihydrochlorid | ETH | 1,7 |
| Rifampicin | Rifadin Rimactan | RIF | 7,99 |
| Pyrazinamid | Pyrazin karboxamid | PZA | 30 - 35 |
| Kanamycin | Kanamycin monosulfát | KM | 2,0 |
| Streptomycin | Streptomycin sulfátová sůl | SM | 25 - 30 |

Inhibice

Míra inhibice (neplatná interní kontrola) testu COBAS® TaqMan® MTB byla stanovena pomocí analýzy několika studií používajících vzorky sputa a BAL a panel s kulturou MTB. Celkem bylo k dispozici 1094 dat. Celková míra inhibice testu COBAS® TaqMan® MTB všech analyzovaných studií (vzorky a panel kultury MTB) byla 0,0 % (0/1094).

LITERATURA

1. World Health Organization Fact Sheet N° 104 Revised April 2005.
2. Tuberculosis Elimination Revisited: Obstacles, Opportunities, and a Renewed Commitment—Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET). *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 1999. **(RR09)**: 1-13.
3. Metchock, B.G., Nolte, F.S. and Wallace, R.J. 1999. *Mycobacterium*, pp. 339-437: In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., eds. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.A. et al. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Bloom, B.R. and Murray, C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. *Science* **257**:1055-1063.
5. Böttger, E.C. 1991. Detection, differentiation, and systematics of bacterial pathogens - the family Mycobacteriaceae. *Immunität und Infektion* **19**:143-152.
6. Daniel, T.M. 1990. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* **116**:277-282.
7. Hermans, P.W.M., Schuitema, A.R.J., Soolingen, D.V. et al. 1990. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1204-1213.
8. CDC. Nucleic Acid Amplification tests for Tuberculosis. *MMWR* **2000**:49.
9. Pfyffer, G.E., Kissling, P., Jahn, E.M.I. et al. 1996. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:834-841.
10. Miller, N., Hernandez, S.G. and Cleary, T.J. 1994. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:393-397.
11. Bergmann, J.S., Keating W.E., Woods G.L. 2000. Clinical evaluation of the BDProbeTec ET system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:863-865.
12. Yuen, K., Yam, W., Wong, L. et al. 1997. Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:1385-1389.
13. J. C. Palomino. 2005. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *European Respiratory Journal* **26**:339-350.
14. Ichihama, S., Iinuma, Y., Tawada, Y. et al. 1996. Evaluation of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche PCR-microwell plate hybridization method (AMPLICOR® *Mycobacterium*) for direct detection of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:130-133.
15. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**:1350-1354.
16. Mullis, K. B. and F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**:335-350.
17. Kent, P.T. and Kubica, G.P. 1985. US DHHS. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
18. Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T. et al. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1751-1759.
19. Longo, M. C., M. S. Berninger, and J. L. Hartley. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, **93**:125-128.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 1999. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 4th Edition. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
21. 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.
22. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition. 2000. 704 pp.

Informace k revizi dokumentu

| | |
|-------------------------|--|
| Doc Rev. 4.0 5/2010 | <p>Harmonizace terminologie pro popis extrahovaných vzorků před přidáním do pracovního Master Mixu; extrahované vzorky před přidáním do MMX se budou od tohoto okamžiku nazývat v celém příbalovém letáku připravené vzorky.</p> <p>Parametry skladování připravených vzorků budou aktualizovány, aby přesně uváděly správné parametry skladování. Znění revidovaného textu: „Připravené vzorky jsou stabilní 4 hodiny při pokojové teplotě nebo 4 dny při teplotě 2-8 °C před přidáním do pracovního Master Mixu.“</p> |
| Doc Rev. 3.1 11/2009 | <p>V části HODNOCENÍ NEKLINICKÝCH FUNKČNÍCH PARAMETRŮ - Korelace bylo v tabulkách 5 a 6 opraveno umístění dat.</p> <p>Pokud máte jakékoliv dotazy, kontaktujte prosím místního zástupce společnosti Roche.</p> |



COBAS® TaqMan® MTB Test vyrobil:

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



Distributed by

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, AMPLIPREP, COBAS a TAQMAN jsou obchodní známky společnosti Roche.

MICROSOFT a WINDOWS XP jsou obchodní známky společnosti Microsoft Corporation ve Spojených státech anebo jiných zemích.

Copyright 2010 Roche Molecular Systems, Inc. Všechna práva vyhrazena.

5/2010

Doc Rev. 4.0

(04803566001-05ENGL)

05174961001-04



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

