

STANDARD **M10** **MTB-RIF/INH**

STANDARD™ M10 MTB-RIF/INH

REF M10-MTB-02

NÁVOD K POUŽITÍ

K použití se systémem STANDARD™ M10



Obsah

1. Zamýšlený účel
2. Shrnutí a vysvětlení
3. Princip postupu
4. Aktivní látka
5. Poskytnuté materiály
6. Skladování a manipulace
7. Vyžadované neposkytnuté materiály
8. Varování a bezpečnostní opatření
9. Chemická rizika
10. Odběr, přeprava a skladování vzorků
11. Postup
12. Interpretace výsledků
13. Kontrola kvality
14. Výkonnost
15. Omezení
16. Reference
17. Symboly

1. Zamýšlený účel

STANDARD M10 MTB-RIF/INH je multiplexní test PCR v reálném čase určený k použití s automatizovaným systémem STANDARD M10 ke kvalitativní detekci DNA komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) a mutací souvisejících s rezistencí na rifampicin (RIF) / izoniazid (INH). Test je určen k použití se vzorky lidského sputa nebo sedimentu sputa od pacientů s klinickým podezřením na plicní tuberkulózu (TBC).

Pozitivní výsledky IS1081 nebo IS6110 svědčí o přítomnosti komplexu *M. tuberculosis*. Stanovení stavu mutace pomocí analýzy křivky tání pro *rpoB*, *katG* a *inhA* současně naznačuje, že detekovaný MTBC může mít rezistenci na rifampicin (RIF) nebo izoniazid (INH). Výsledek bez lékové rezistence nevylučuje jiné mechanismy rezistence.

Slouží jako pomůcka k diagnostice infekčního stavu pacienta. Stanovení infekčního stavu pacienta vyžaduje klinickou korelaci s anamnézou pacienta a dalšími diagnostickými informacemi. Negativní výsledky testů by neměly být používány jako jediný základ pro rozhodování o léčbě pacienta. Negativní výsledky je třeba posoudit společně s klinickým pozorováním, anamnézou pacienta a epidemiologickými informacemi. STANDARD M10 MTB-RIF/INH je určen k použití vyškolenými zdravotnickými pracovníky v nemocničních laboratořích nebo klinických diagnostických laboratořích, nikoli k testování v blízkosti pacienta.

2. Shrnutí a vysvětlení

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění, které je způsobeno infekcí organismy *M. tuberculosis*. Od pacientů s respirační tuberkulózou se na nové hostitele přenáší vzduchem. U nově infikovaných jedinců se příznaky TB projeví během týdnů až měsíců.

M. tuberculosis může v lidském těle způsobovat onemocnění téměř jakékoli tkáně nebo orgánu, jako například plic, ledvin, nervů a kostí. Nejčastější je plicní tuberkulóza, infekce plicní tkáně. TBC má v závislosti na infikovaném orgánu různé příznaky. Tuberkulóza ledvin například způsobuje příznaky cystitidy, jako je hematurie, potíže s močením a časté močení. Tuberkulóza páteře způsobuje bolesti v dolní části zad. Tuberkulózní meningitida může způsobovat příznaky, jako jsou bolesti hlavy a zvracení. V případě nejčastějšího typu tuberkulózy, plicní tuberkulózy, se vyskytují příznaky, jako je kašel, bolest na hrudi, neúmyslný úbytek hmotnosti a horečka.

Rifampicin je semisyntetický derivát léčiva rifamycinu B extrahovaného ze *S. mediterranei*, který se používá jako základní léčivo pro léčbu TBC. Rifampicin se váže na β -podjednotku bakteriální RNA polymerázy závislé na DNA (RNAP) a narušuje iniciaci syntézy RNA. Rifampicin tedy účinně funguje jako antibiotikum tím, že inhibuje základní bakteriální aktivitu. Mutace genu *rpoB* na β -podjednotce způsobuje snížení afinity RNAP k rifampicinu a způsobuje rezistenci bakterií vůči rifampicinu.

Isoniazid účinně působí proti aktivnímu komplexu *M. tuberculosis*. Isoniazid je proléčivo, které je aktivováno silným enzymem katalázou do aktivní formy acylových radikálů, enzym se nazývá kataláza-peroxidáza (KatG) a je kódována genem *katG*. Aktivní forma sloučeniny narušuje biosyntézu kyseliny mykolové tak, že inhibuje enoyl-acyl nosné proteinové reduktázy závislé na NADH, které jsou kódovány genem *inhA*. Mykolová kyselina je základním stavebním prvkem mykobakteriální buněčné stěny. Mutace v genu *katG* a v genu *inhA* mají za následek snížení nebo ztrátu antibakteriální aktivity izoniazidu v důsledku inaktivace *katG* a strukturálních změn ve sloučeninách izoniazidu. V případě multirezistentní tuberkulózy (MDR-TB), která je rezistentní vůči rifampicinu a současně izoniazidu, není účinek standardní léčby první linie dostatečný. Je proto zapotřebí protituberkulózní režim druhé linie. Pro účinnou léčbu pacientů s tuberkulózou by měly být současně s diagnózou komplexu *M. tuberculosis* prováděny testy rezistence na rifampicin a izoniazid.

[Popis cartridge]

STANDARD M10 MTB-RIF/INH je molekulární diagnostický test *in vitro*, který současně slouží jako pomůcka k detekci a diferenciaci genů *IS1081* a *IS6110* komplexu MTB a genů *rpoB*, *katG* a *inhA* jako multirezistentního parametru založeného na technologii amplifikace nukleových kyselin a testu tání. STANDARD M10 MTB-RIF/INH obsahuje pufr pro extrakci bakteriální DNA a činidla PCR pro *in vitro* kvalitativní detekci genů *IS1081* a *IS6110* komplexu *M. tuberculosis* a genů *rpoB*, *katG*, *inhA* jako multirezistentního parametru ve vzorku lidského nezpracovaného sputa nebo sedimentu sputa.



Obrázek 1. Rozvržení cartridge STANDARD M10 MTB-RIF/INH

3. Princip postupu

Test STANDARD M10 MTB-RIF/INH je automatizovaný diagnostický *in vitro* test ke kvalitativní detekci MTBC a rezistence na RIF/INH. Test STANDARD M10 MTB-RIF/INH se provádí v systému STANDARD M10. Systém STANDARD M10 automatizuje a integruje preparaci vzorků, extrakci nukleové kyseliny a amplifikaci a detekci cílových sekvencí v různých vzorcích pomocí molekulárních diagnostických testů. Systém obsahuje součásti STANDARD M10 Module a STANDARD M10 Console s nainstalovaným softwarem pro provádění testů a zobrazování výsledků. Systém vyžaduje použití jednorázových cartridge, které obsahují reagenty k extrakci nukleových kyselin a PCR a ve kterých probíhá proces extrakce nukleových kyselin a PCR. Jelikož cartridge jsou uzavřené, riziko křížové kontaminace mezi vzorky je minimální. Cartridge navíc obsahuje UDG (Uracil-DNA glykosyláza), což může zabránit přenosné kontaminaci produktů PCR amplifikace. Úplný popis systémů se nachází v uživatelské příručce k systému STANDARD M10.

STANDARD M10 MTB-RIF/INH zahrnuje čidla pro detekci DNA z genu *IS6110*, genu *IS1081*, genu *rpoB*, genu *katG* a genu *inhA* MTBC v nezpracovaných vzorcích sputa nebo koncentrovaných sedimentech sputa. Cartridge obsahuje interní kontrolu pro adekvátní zpracování vzorku a PCR reakci v reálném čase. Tabulka níže indikuje, který cíl je určen pro detekci kterým kanálem.

Tabulka 1. Fluorescenční kanál každého cílového genu

Patogen	Cílový gen	Kanál
<i>M. tuberculosis</i>	<i>IS1081</i>	HEX
	<i>IS6110</i>	HEX
<i>M. tuberculosis</i> – RIF	<i>rpoB</i>	FAM
<i>M. tuberculosis</i> – INH	<i>katG</i>	HEX
	<i>inhA</i>	HEX
Interní kontrola	Interní kontrola (IC)	Cy5

4. Aktivní látky

- Klen-taq Polymeráza 107,25 U/kulička
- Uracil-DNA-glykosyláza (UDG) 2,15 U/kulička
- Cílové primery a sondy 2–30 pmol

5. Poskytnuté materiály

STANDARD M10 MTB-RIF/INH obsahuje dostatečné reagenty pro zpracování 10 vzorků nebo vzorků pro kontrolu kvality.

Tabulka 2. Obsah sady STANDARD M10 MTB-RIF/INH

-	Obsah	Počet	Použití v každé reakci
1	Cartridge	10	1
2	Roztok pro předběžnou úpravu sputa	10 (8 mL/injekční lahvička)	1
3	STANDARD™ Disposable Dropper (1.4 mL)	20	2
4	Sonikační zkumavka (2,0 mL)	10	1
5	Stručné referenční pokyny	1	-

6. Skladování a manipulace

STANDARD M10 MTB-RIF/INH uchovávejte při teplotě 2-28 °C (36-82 °F). Neodstraňujte bezpečnostní klip cartridge a nestlačujte cartridge až do použití. Nepoužívejte cartridge, ze které uniká tekutina nebo která je mokrá. Tato sada být uchovávána při vhodné teplotě a chráněna před UV/slunečním zářením. Za těchto okolností mohou být cartridge skladovány do data expirace vytištěného na štítku.

7. Vyžadované neposkytnuté materiály

- STANDARD M10 s uživatelskou příručkou
Alespoň jedna STANDARD M10 Console (kat. č. 11M1011) a jeden STANDARD M10 Module (kat. č. 11M1012)
- Nástroje pro odběr a přenos vzorků
 - Nádobka na vzorky
 - 0,067M pufr fosfát/H₂O
 - Mikropipeta s filtračními hroty
- Sonikátor
- OOPP (osobní ochranné pracovní prostředky)
- Nádobka na biologicky nebezpečný odpad

8. Varování a bezpečnostní opatření

- 1) Tato sada slouží pouze k diagnostice *in vitro*.
- 2) Pouze k profesionálnímu použití.
- 3) Než provedete test, pozorně si přečtete návod k použití.
- 4) Nesprávný odběr, přenos, skladování a zpracování vzorků může způsobit chybné výsledky testu.
- 5) Před použitím neodstraňujte bezpečnostní klip cartridge.
- 6) Do skutečného použití cartridge nestlačujte.
- 7) Nepoužívejte cartridge, ze které uniká tekutina nebo která je mokrá.
- 8) Cartridge skladujte mimo dosah UV/slunečního záření a uchovávejte ji v suchu.
- 9) Nepoužívejte sadu po uplynutí data expirace.
- 10) Cartridge neprotřepávejte, nenaklánějte ji ani ji neobracejte naruby, zejména po jejím stisknutí a propíchnutí uzávěru. Mohlo by to způsobit neurčitě výsledky.
- 11) Nepoužívejte cartridge s poškozenou etiketou s čárovým kódem.
- 12) Nepoužívejte již použité cartridge.
- 13) Se všemi vzorky pacientů se musí zacházet tak, jako by byly infekční.
- 14) Všechny materiály musí být považovány za potenciálně infekční a je třeba s nimi zacházet opatrně.
- 15) Protože tento test zahrnuje extrakci bakteriální DNA a amplifikaci PCR, je třeba dbát opatrnosti a předcházet kontaminaci. Doporučuje se pravidelně monitorovat případnou kontaminaci laboratoře.
- 16) Používání této sady se musí přesně řídit pokyny a musí se provádět podle technických požadavků dané klinické

- laboratoře, ve které se amplifikují geny.
- 17) Pro řádnou likvidaci použitých cartridgí a nepoužitých činidel se řiďte postupy vaší instituce pro ekologické nakládání s odpady.
 - 18) Cartridge nepoužívejte, pokud uplynulo již více než 12 měsíců od otevření stříbrné fólie.
 - 19) Komplex M. tuberculosis a mutaci lékové rezistence nelze diagnostikovat pouze na základě výsledků této sady a potvrzenou diagnózu musí stanovit odborník s ohledem na další testy nebo klinické výsledky.
 - 20) Jakákoli závažná událost, ke které dojde v souvislosti s touto sadou, musí být nahlášena výrobci nebo jeho autorizovanému zástupci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém se uživatel a/nebo pacient nachází, v souladu s požadavky nařízení EU č. 2017/746.
 - 21) Souhrn údajů o bezpečnosti a klinické funkci je k dispozici v databázi EUDAMED.

9. Chemická rizika

Tato sada obsahuje součásti klasifikované níže v souladu s nařízením (ES) č. 1272/2008:

* **Symbol nebezpečnosti:**



* Klíčové slovo: Nebezpečí

* **Věty o nebezpečnosti:**

- H314 Způsobuje závažné poleptání kůže a poškození očí
- H318 Způsobuje vážné poškození očí

* **P-věty:**

1) Prevence

- P260 Nevdechujte prach / dým / plyn / mlhu / páry / aerosoly.
- P264 Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.
- P280 Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít / chrániče sluchu.

2) Reakce

- P301 + P330 + P331 PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení.
- P303 + P361 + P353 PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou / osprchujte.
- P304 + P340 PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.
- P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
- P310 Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.
- P321 Odborné ošetření
- P363 Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte.

3) Skladování

- P405 Skladujte uzamčené.

4) Likvidace

- P501 Obsah/obal zlikvidujte v souladu s místními/oblastními/státními/mezinárodními předpisy.

10. Odběr, přeprava a skladování vzorků

Řádný odběr, přeprava a skladování vzorků jsou pro provedení testu klíčové. Nesprávný odběr vzorků, nevhodná manipulace se vzorky a/nebo jejich nevhodná přeprava může vést k chybným výsledkům.

10.1 Odběr vzorků

Nezpracované sputum odebírejte podle standardního protokolu vaší instituce pro odběr vzorků a testování nezpracovaného sputa nebo koncentrovaného/dekontaminovaného sedimentu sputa.

Typ požadovaných vzorků:

- Nezpracované sputum
- Sediment sputa dekontaminovaný a koncentrovaný pomocí NALC-NaOH

Odebrané vzorky musí být před testováním pomocí STANDARD M10 MTB-RIF/INH předběžně ošetřeny roztokem pro předúpravu sputa.

Stanovení odpovídajícího objemu vzorku k předúpravě dvou druhů vzorku roztokem pro předúpravu (PS) viz tabulka 3.

Tabulka 3. Požadavek na objem vzorku

	Typ vzorku	
	Nezpracované sputum	Sediment sputa
Minimální objem vzorku	0,5 mL	
Vzorek do roztoku pro předúpravu (PS) Poměr	1 : 2	

10.2 Skladování a přeprava vzorků

Sediment sputa: Resuspendovaný sediment sputa můžete uchovávat a přepravovat při teplotě 2-8 °C (36-46 °F) až sedm dnů, při teplotě 15-30 °C až 2 dny (48 hodin), při teplotě -20 °C (-4 °F) až 6 měsíců

Nezpracované sputum: Sputum můžete uchovávat a přepravovat při teplotě 2-8 °C (36-46 °F) až sedm dnů, při teplotě 15-30 °C až 30 hodin, při teplotě -20 °C (-4 °F) až 6 měsíců

11. Postup

11.1 Postup přípravy vzorku

11.1.1 Postup v případě nezpracovaného sputa

- 1) Nezpracované sputum připravte v nádobce na odběr vzorků a s roztokem pro předúpravu (PS).
- 2) Opatrně otevřete víčko nádoby na odběr sputa a odstraňte pevné částice, které by mohly test ovlivnit.
- 3) K nezpracovanému sputu přidejte přibližně dvojnásobek objemu PS (nezpracované sputum: PS = 1 : 2) v nádobce a zajistěte víčko.
Poznámka: K dalším krokům je potřeba více než 0,5 mL nezpracovaného sputa.
- 4) Sputum dvakrát 10 sekund důkladně třepejte, abyste se ujistili, že se nezpracované sputum a PS zcela smíchají.
- 5) Směs vzorku inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
- 6) Jednorázovým kapátkem STANDARD™ Disposable dropper (1.4 mL) přeneste 1,4 mL směsi vzorku do sonikační zkumavky (2,0 mL).
- 7) Sonikační zkumavku označte a směs vzorku ve zkumavce sonikujte po dobu 90 sekund.
- 8) Připravený vzorek se používá v postupu popsáném v kapitole 11.3.

11.1.2 Postup v případě koncentrovaného/dekontaminovaného sedimentu sputa

- 1) Sediment sputa připravte v nádobce na odběr vzorků s 0,067M pufrém fosfátu/H₂O.
Opatrně otevřete víčko nádoby na odběr sedimentu sputa a přidejte 0,067M pufr fosfátu/H₂O pro suspenzi.
Poznámka: K dalším krokům je potřeba více než 0,5 mL suspendovaného sputa.
- 2) Nádobku pevně uzavřete a dostatečně protřepejte, dokud nebude sediment sputa zcela suspendován.
- 3) K suspendovanému sedimentu sputa přidejte přibližně dvojnásobek objemu PS (sediment sputa:PS = 1:2) v nádobce a zajistěte víčko.
- 4) Sputum dvakrát 10 sekund důkladně třepejte, abyste se ujistili, že se suspendovaný sediment sputa a PS zcela smíchají.
- 5) Směs vzorku inkubujte 15 minut při pokojové teplotě.
- 6) Jednorázovým kapátkem STANDARD™ Disposable Dropper (1.4 mL) přeneste 1,4 mL směsi vzorku do sonikační zkumavky (2,0 mL).
- 7) Sonikační zkumavku označte a směs vzorku ve zkumavce sonikujte po dobu 90 sekund.
- 8) Připravený vzorek se používá v postupu popsáném v kapitole 11.3.

11.2 Spuštění systému STANDARD M10

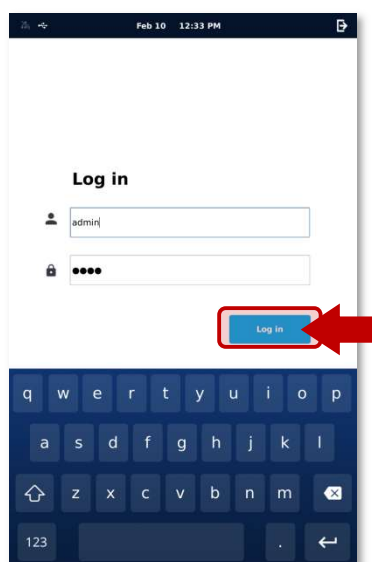
Poznámka	Podrobný návod najdete v uživatelské příručce k systému STANDARD M10 . Pokud jste naskenovali čárový kód cartridge v systému STANDARD M10 a verze softwaru není kompatibilní, objeví se chybové hlášení „Not Supported Device (Nepodporovaný prostředek)“. Před provedením testu aktualizujte software.
-----------------	--

- 1) Spustíte systém STANDARD M10.
- 2) Zkontrolujete, že STANDARD M10 Console a STANDARD M10 Module jsou zapojené a funkční.



Obrázek 2. Připojení k síti

- 3) Na obrazovce přihlášení na STANDARD M10 Console zadejte ID uživatele a heslo a klikněte na „Log In“ (Přihlásit se).
- 4) Dotkněte se STANDARD M10 Module pro aktivaci domovské obrazovky.
(Dvířka vybraného STANDARD M10 Module se automaticky otevrou, aby mohla být vložena cartridge).



Obrázek 3. Obrazovka přihlášení



Obrázek 4. Domovská obrazovka

- 5) Naskenováním čárového kódu nebo pomocí virtuální klávesnice na obrazovce M10 Console zadejte ID pacienta a ID vzorku.
(ID pacienta je volitelné. Možnost ID pacienta můžete vypnout v „Nastavení“.)

- 6) Zadejte ID vzorku pomocí naskenování čárového kódu vzorku nebo pomocí virtuální klávesnice na obrazovce M10 Console.
Ujistěte se, že je víčko tubičky na vzorek při skenování čárového kódu ID vytištěného na tubičce na vzorek pevně nasazeno.
(Pro testování kontroly kvality zaškrtněte políčko QC.)
- 7) Naskenujte cartridge STANDARD M10 MTB-RIF/INH, která má být použita. Na základě čárového kódu cartridge STANDARD M10 Module automaticky rozpozná test, který má být proveden.



Obrázek 5. Zadávání ID vzorku



Obrázek 6. Skenování cartridge

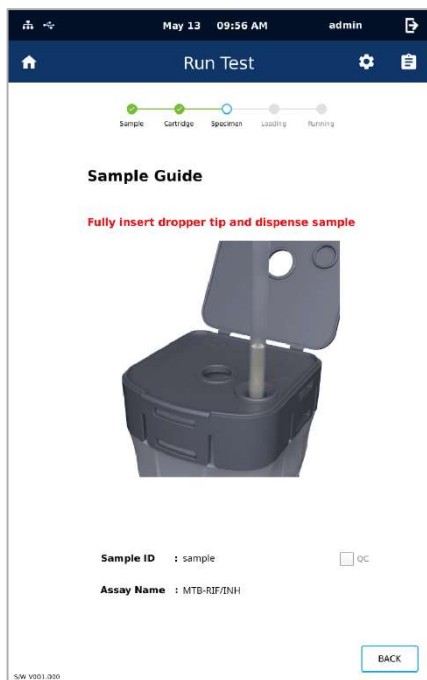
11.3 Vložení vzorku do cartridge STANDARD M10 MTB- RIF/INH

 Upozornění Poznámka	Test doporučujeme zahájit do 30 minut od vložení vzorku do cartridge STANDARD M10 MTB-RIF/INH. Výsledek může být falešně negativní, pokud není do cartridge vloženo dostatečné množství vzorku.
---	---

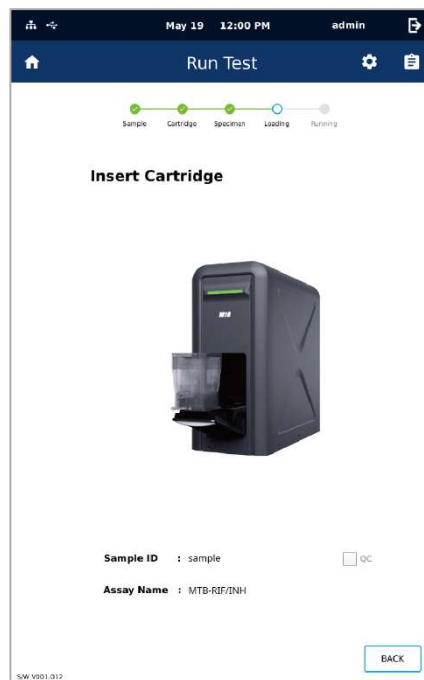
- 1) Odstraňte bezpečnostní klip, který se nachází pod víčkem cartridge.
- 2) Propíchněte utěsněnou cartridge stlačeními uzávěru, dokud zcela nezapadne do drážky pro cartridge.
- 3) Otevřete víčko a zkontrolujte, zda je uzávěr zcela propíchnut, než vložíte vzorek.
- 4) Opatrně otevřete víčko tubičky na vzorek nebo externí kontrolu kvality.
- 5) Viz obrázek 7. Jednorázovým kapátkem STANDARD™ Disposable dropper (1.4 mL) přeneste celý vzorek sonikovaného vzorku do cartridge.
- 6) Po několika sekundách se obrazovka průvodce pro vzorek automaticky změní na obrazovku vložení cartridge. Dotkněte se obrazovky průvodce pro vzorek, pokud chcete průvodce přeskočit.
- 7) Uzavřete víčko.



Obrázek 7. Vložení vzorku



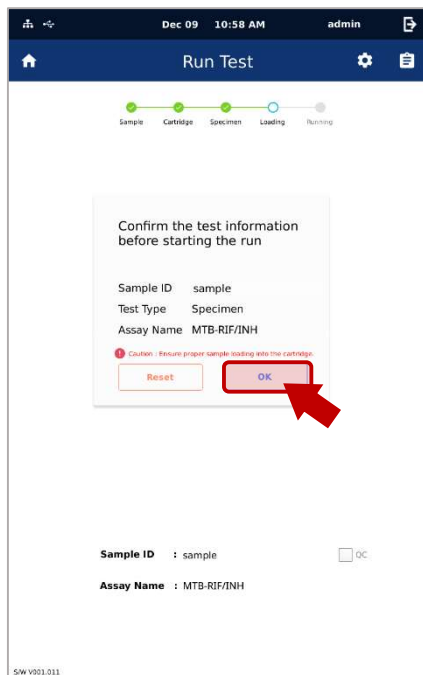
Obrázek 8. Obrazovka průvodce pro vzorek



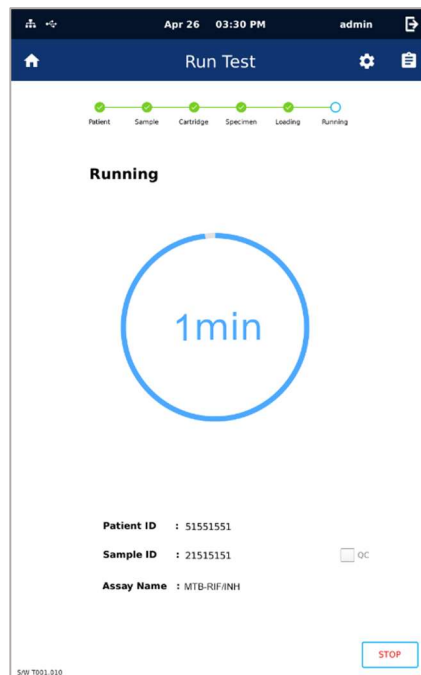
Obrázek 9. Obrazovka vložení cartridge

11.4 Spuštění testu

- 1) Vložte cartridge na vybraný STANDARD M10 Module tak, aby amplifikační komora směřovala dovnitř modulu. (Indikátor stavu na vybraném modulu bude blikat zeleně.)
- 2) Zcela zavřete dvířka. Po potvrzení informací o vzorku a cartridge se dotkněte tlačítka „OK“ na obrazovce. (Dotkněte se tlačítka „Reset (Resetovat)“ pro opětovné zadání informací.)
- 3) Test se automaticky spustí a zbývající čas se objeví na obrazovce.



Obrázek 10. Obrazovka potvrzení testu



Obrázek 11. Obrazovka probíhajícího testu

- 4) Když je test dokončen, obrazovka se změní na vyhodnocení a zobrazí se výsledek.
- 5) Použité cartridge vyhodte do příslušných nádob na odpadní vzorky podle standardní praxe ve vaší instituci.
- 6) Po kontrole, zda je výsledek „Valid (Platný)“, se dotkněte ikony domovské obrazovky () a opakujte postup. (Pokud je k dispozici jiný STANDARD M10 Module připojený ke STANDARD M10 Console, můžete zahájit nový test, zatímco běží jiný test.)

12. Interpretace výsledků

Výsledky jsou interpretovány automaticky pomocí STANDARD M10 Console a jsou jasně zobrazeny na obrazovce vyhodnocení. STANDARD M10 MTB-RIF/INH poskytuje výsledky testu na základě detekce příslušných cílových genů podle algoritmů zobrazených v tabulce 4.

Tabulka 4. Interpretace výsledků

Result (Výsledek)	MTBC	RIF	INH	IC
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	+	R+	R+	+/-
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF Není detekována rezistence na INH	+	R+	R-	+/-
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	+	R+	Rx	+/-
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	+	R-	R+	+/-
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	+	Rx	R+	+/-
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF NENÍ detekována rezistence na INH	+	R-	R-	+/-
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	+	R-	Rx	+/-
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF NENÍ detekována rezistence na INH	+	Rx	R-	+/-
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	+	Rx	Rx	+/-
Negativní na MTBC	-	N/A	N/A	+
Neplatný	-	N/A	N/A	-
Chyba	Žádný výsledek			

Result (Výsledek)	Interpretace
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF NENÍ detekována rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC Je detekována rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • Rezistenci na INH nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> nebyly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF Je detekována rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • Rezistenci na RIF nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. • V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF NENÍ detekována rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> nebyly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC NENÍ detekována rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	• Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). • V cílových sekvencích <i>rpoB</i> nebyly detekovány mutace spojené s rezistencí na RIF. • Rezistenci na INH nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. • IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.

Result (Výsledek)	Interpretace
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF NENÍ detekována rezistence na INH	- Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). - Rezistenci na RIF nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. - V cílových sekvencích <i>katG</i> a <i>inhA</i> byly detekovány mutace spojené s rezistencí na INH. - IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Pozitivní na MTBC Neurčitá rezistence na RIF Neurčitá rezistence na INH	- Je detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). - Rezistenci na RIF nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. - Rezistenci na INH nelze určit z důvodu nedostatečné detekce signálu. - IC: N/A (nevztahuje se); IC je ignorována, protože amplifikace cíle MTB může způsobit zpoždění IC Ct.
Negativní na MTBC	- Není detekována cílová DNA MTBC (IS1081 nebo IS6110). - IC: Platná; je detekován signál IC. - Signál IC má hodnotu Ct v platném rozsahu.
Neplatný	- Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA MTBC nelze určit. - IC: Neplatná; pokud není detekován MTBC a jeden ze signálů IC je mimo platný rozsah. - Opakujte test.
Chyba	- Přítomnost nebo nepřítomnost cílové DNA MTBC nelze určit. - Opakujte test.

Outcome (Výsledek) (Domovská obrazovka)	Result (Výsledek) (Obrazovka vyhodnocení)	Popis
Je detekována pozitivní rezistence		Pozitivní na MTBC a detekována rezistence na RIF nebo INH
NENÍ detekována pozitivní rezistence		Pozitivní na MTBC a nebyla detekována rezistence na RIF nebo INH
Neurčitá pozitivní rezistence		Pozitivní na MTBC a neurčitá rezistence na RIF nebo INH
Negativní		Negativní na MTBC
Neplatný		Neplatná
Chyba		Chyba

Result (Výsledek) (Obrazovka shrnutí)	Popis
	Pozitivní na MTBC
	Negativní na MTBC
	Detekována rezistence
	Není detekována rezistence

R×	Neurčitá rezistence
V	Platná
!	Neplatná
X	Chyba

Poznámka	Pokud je detekován signál MTBC, ale není dostatečně silný k posouzení rezistence, je možný výsledek Neurčitá rezistence.
-----------------	--

13. Kontrola kvality

Postupy kontroly kvality jsou určeny ke sledování výkonu cartridge a testu. Pokud kontroly nejsou platné, výsledek pacienta nelze interpretovat.

Interní kontrola (IC):

Zajišťuje, že se použije správný vzorek, reagentie v kazetě jsou funkční, ve vzorku nejsou žádné další rušivé faktory a postup je proveden správně. Pokud IC selže a není detekován MTBC, je výsledek neplatný.

Externí kontroly:

Externí kontroly (PC a NC) musí být používány podle potřeby v souladu s příslušnými místními a státními akreditačními organizacemi.

- Pozitivní kontrola (PC):

1. AMPLIRUN® TOTAL AMPLIRUN® TOTAL MTB CONTROL (SPUTUM) (Vircell, MBTC013)
2. AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL (SPUTUM) (Vircell, MBTC014)
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT (531) CONTROL (SPUTUM)
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT (526) CONTROL (SPUTUM)
3. AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT CONTROL (SPUTUM) (Vircell, MBTC015)
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT (katG) CONTROL (SPUTUM)
 - AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT (inhA) CONTROL (SPUTUM)

- Negativní kontrola (NC): 1x fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) (jakýkoli výrobce)

[Postup testování]

Pozitivní kontrola (PC) by měla být zředěna na koncentraci přibližně 500 kopií/mL. Níže jsou uvedeny stručné metody přípravy závěrečných pozitivních a negativních kontrol.

- (1) Připravte 1x pufr PBS jako negativní kontrolu.
- (2) K rehydrataci 5 typů pozitivní kontroly přidejte do každé lahvičky 1000 µL 1x pufru PBS.
- (3) Všechny lahvičky třepejte na třepače dobu 30 vteřin, aby se obsah úplně rozpustil a homogenizoval.
- (4) Všechny pozitivní kontrolní materiály zředte 1x puforem PBS na konečnou koncentraci 500 cp/mL.
- (5) Do všech kontrolních materiálů přidejte přibližně dvojnásobek objemu PS (kontrolní materiál: PS = 1:2)
- (6) Pipetou s filtračním hrotem naneste do cartridge 1400 µL připraveného kontrolního vzorku (PC 1, PC 2, PC 3, PC 4, PC 5, NC).
- (7) Zaškrtněte políčko QC a spusťte test. Podrobné použití viz uživatelská příručka nástroje STANDARD M10.

[Použití materiálů pro externí kontrolu kvality]

Kontrola kvality se doporučuje při změně laboratorního prostředí, při změně šarže produktu nebo při instalaci nového přístroje.

Doporučení výrobce by však měla být použita jako referenční vodítko, zatímco četnost a způsob kontroly kvality by měly být stanoveny na základě charakteristik každé laboratoře a interních požadavků na řízení kvality. Kromě toho musí být požadavky na kontrolu kvality prováděny v souladu s místními, státními a federálními předpisy nebo akreditačními požadavky, jakož i se standardními postupy kontroly kvality každé laboratoře.

14. Výkonnost

14.1 Mez detekce

Ke stanovení meze detekce (LoD) byly použity kmeny citlivé na *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* zředěné ve sputu a sedimentu sputu. K vyhodnocení citlivosti pro detekci rezistence vůči rifampicinu (RIF) a isoniazidu (INH) byly ke stanovení koncentrací LoD testovány rezistentní kmeny nesoucí mutace v genech *rpoB*, *katG* a *inhA*. Klinické hodnocení bylo prováděno tři dny s použitím dvou šarží reagensů. Pro každý kmen bylo testováno osm úrovní koncentrací s 24 replikáty na koncentraci. LoD byla stanovena pomocí probitové analýzy. Pozitivita MTBC byla potvrzena detekcí genů *IS1081* a *IS6110* a rezistence na léčivo byla stanovena na základě analýzy teploty tání (*T_m*). Výsledky studie LoD jsou uvedeny níže.

[Sputum]

Souhrn výsledků testu LoD

Druhy mykobakterií (kmen)	Cílový gen	Prokázaná LoD (CFU/mL)	Komplexní LoD (CFU/mL)
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	<i>IS1081</i>	3,50	3,50
	<i>IS6110</i>	1,75	
<i>M. bovis</i>	<i>IS1081</i>	0,88	0,88
	<i>IS6110</i>	0,26	
0B269	mutace <i>rpoB</i> (kodon 511)	19,59	19,59
0B012	mutace <i>katG</i> (S315T)	51,03	73,83
	mutace <i>rpoB</i> (kodon 516)	73,83	
4B252	mutace <i>inhA</i> (C(-15)T)	9,78	18,56
	Mutace <i>rpoB</i> (kodon 526)	18,56	
0B129	mutace <i>katG</i> (kodon 315)	1,43	1,85
	mutace <i>rpoB</i> (kodon 513)	1,85	

Shrnutí výsledků testu LoD s použitím mezinárodního standardního materiálu WHO

Druhy mykobakterií (kmen)	Cílový gen	Prokázaná LoD (CFU/mL)	Komplexní LoD (cp/mL)
Mezinárodní standardní materiál WHO (20/152) (<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv))	<i>IS1081</i>	36,18	36,18
	<i>IS6110</i>	9,67	

[Sediment sputa]

Souhrn výsledků testu LoD

Druhy mykobakterií (kmen)	Cílový gen	Prokázaná LoD (CFU/mL)	Komplexní LoD (CFU/mL)
<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv)	<i>IS1081</i>	2,25	2,25
	<i>IS6110</i>	0,32	
<i>M. bovis</i>	<i>IS1081</i>	0,20	0,56
	<i>IS6110</i>	0,56	
0B269	Mutace <i>rpoB</i> (kodon 511)	6,05	6,05
0B012	mutace <i>katG</i> (S315T)	36,95	36,95
	Mutace <i>rpoB</i> (kodon 516)	35,23	
4B252	mutace <i>inhA</i> (C(-15)T)	4,84	4,84
	Mutace <i>rpoB</i> (kodon 526)	3,49	
0B129	mutace <i>katG</i> (kodon 315)	1,64	1,68
	Mutace <i>rpoB</i> (kodon 513)	1,68	

Shrnutí výsledků testu LoD s použitím mezinárodního standardního materiálu WHO

Druhy mykobakterií (kmen)	Cílový gen	Prokázaná LoD (CFU/mL)	Komplexní LoD (cp/mL)
Mezinárodní standardní materiál WHO (20/152) (<i>M. tuberculosis</i> (H37Rv))	<i>IS1081</i>	41,43	41,43
	<i>IS6110</i>	9,94	

14.2 Inkluzivita

Inkluzivita testu STANDARD M10 MTB-RIF/INH byla hodnocena u 24 druhů *Mycobacterium* včetně 7 typů divokých kmenů MTBC. V důsledku toho byla potvrzena 100% detekce MTBC včetně hlavních kmenů (*M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. caprae*, *M. africanum*) a ověřena inkluzivita STANDARD M10 MTB-RIF/INH potvrzením LoD pro každý kmen divokého typu. Byla také potvrzena inkluzivita pro genetickou variabilitu související s rezistencí vůči lékům a ověřena inkluzivita potvrzením LoD pro každý mutantní kmen.

[Sputum]

Č.	Kmen	IS1081 a IS6110 Komplexní LoD
1	<i>M. bovis</i> BCG	80 CFU/mL
2	<i>M. microti</i>	40 cp/mL
3	<i>M. caprae</i>	200 cp/mL
4	<i>M. africanum</i>	200 cp/mL
5	<i>M. tuberculosis</i> _KTMA-0004 (linie 1)	40 CFU/mL
6	<i>M. tuberculosis</i> _0A083 (linie 2)	1,6 CFU/mL
7	<i>M. tuberculosis</i> _0A077 (linie 3)	0,8 CFU/mL

[Sediment sputa]

Č.	Kmen	IS1081 a IS6110 Komplexní LoD
1	<i>M. bovis</i> BCG	3,2 CFU/mL
2	<i>M. microti</i>	40 cp/mL
3	<i>M. caprae</i>	8 cp/mL
4	<i>M. africanum</i>	40 cp/mL
5	<i>M. tuberculosis</i> _KTMA-0004 (linie 1)	8 CFU/mL
6	<i>M. tuberculosis</i> _0A083 (linie 2)	0,32 CFU/mL
7	<i>M. tuberculosis</i> _0A077 (linie 3)	0,16 CFU/mL

14.3 Zkřížená reaktivita

K vyhodnocení křížové reaktivity STANDARD™ M10 MTB-RIF/INH bylo testováno 92 patogenů (virů a bakterií), které mohou způsobovat příznaky podobné příznakům cílového patogenu. Každý vzorek byl testován třikrát. V důsledku toho bylo potvrzeno, že mezi cílovými geny (IS1081, IS6110, katG, inhA a rpoB geny) a všemi 92 zkříženými reaktivními látkami neexistuje žádná zkřížená reaktivita.

Č.	Materiál se zkříženou reaktivitou	Koncentrace (jednotka/mL)	Jednotka
1	<i>M. avium</i>	1,00E+06	CFU
2	<i>M. chelonae</i>	1,00E+06	CFU
3	<i>M. malmoense</i>	1,00E+06	CFU
4	<i>M. marinum</i>	1,00E+06	CFU
5	<i>M. scrofulaceum</i>	1,00E+06	CFU
6	Komplex <i>M. terrae</i>	1,00E+06	CFU
7	<i>M. smegmatis</i>	1,00E+06	CFU
8	<i>Candida albicans</i>	1,00E+06	CFU
9	<i>Candida tropicalis</i>	1,00E+06	CFU
10	Lidský adenovirus 1	1,00E+05	TCID ₅₀
11	Lidský adenovirus 11	1,00E+05	TCID ₅₀
12	Lidský adenovirus 2	1,00E+05	TCID ₅₀
13	Lidský adenovirus 3	1,00E+05	TCID ₅₀
14	Lidský adenovirus 4	1,00E+05	TCID ₅₀
15	Lidský adenovirus 5	1,00E+05	TCID ₅₀
16	Lidský adenovirus 6	1,00E+05	TCID ₅₀
17	Lidský mastadenovirus B7	1,00E+05	TCID ₅₀
18	Lidský adenovirus 34	1,00E+05	TCID ₅₀
19	Lidský mastadenovirus B	1,00E+05	TCID ₅₀
20	Lidský adenovirus 16	1,00E+05	TCID ₅₀
21	Lidský adenovirus 12	1,00E+05	TCID ₅₀
22	Lidský adenovirus 50	1,00E+05	TCID ₅₀
23	Lidský adenovirus 40	1,00E+05	PFU
24	Lidský koronavirus 229E	1,00E+05	TCID ₅₀
25	Lidský koronavirus OC43	1,00E+05	TCID ₅₀
26	SARS-CoV-2	1,00E+05	TCID ₅₀
27	MERS-CoV	1,00E+05	TCID ₅₀
28	Lidský coxsackievirus A 21	1,00E+05	TCID ₅₀
29	Lidský coxsackievirus B 2	1,00E+05	TCID ₅₀
30	Chřipka A H3N2 (Perth/16/09)	1,00E+05	TCID ₅₀
31	Chřipka A H3N2 (Victoria/361/11)	1,00E+05	TCID ₅₀
32	Virus chřipky B (BY)	1,00E+05	CEID ₅₀
33	Virus chřipky B (linie Yamagata)	1,00E+05	CEID ₅₀
34	Lidský respirační syncytiální virus A	1,00E+05	PFU

35	Virus parainfluenzy (typ 2)	1,00E+05	TCID ₅₀
36	Virus parainfluenzy (typ 1)	1,00E+05	TCID ₅₀
37	Virus parainfluenzy (typ 3)	1,00E+05	TCID ₅₀
38	Virus parainfluenzy (typ 4A)	1,00E+05	TCID ₅₀
39	Enterovirus D68	1,00E+05	TCID ₅₀
40	Enterovirus A71	1,00E+05	TCID ₅₀
41	Virus Epsteina-Barrové	1,00E+05	kopie
42	Flavivirus (virus japonské encefalidity)	1,00E+05	PFU
43	Virus hepatitidy B	1,00E+05	IU
44	Virus hepatitidy C	1,00E+05	CFU
45	Lidský herpesvirus 1	1,00E+05	PFU
46	Lidský herpesvirus 2	1,00E+05	PFU
47	Lidský betaherpesvirus 5	1,00E+05	PFU
48	Varicellovirus	1,00E+05	TCID ₅₀
49	Lidský rhinovirus 16	1,00E+05	TCID ₅₀
50	Lidský rhinovirus 14	1,00E+05	PFU
51	Lidský metapneumovirus 16 typu A1	1,00E+05	TCID ₅₀
52	Virus příušnic	1,00E+05	TCID ₅₀
53	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1,00E+06	CFU
54	<i>Bacillus cereus</i>	1,00E+06	CFU
55	<i>Bacteroides fragilis</i>	1,00E+06	CFU
56	<i>Burkholderia cepacia</i>	1,00E+06	CFU
57	<i>Citrobacter freundii</i>	1,00E+06	CFU
58	<i>Enterococcus faecium</i>	1,00E+06	CFU
59	<i>Escherichia coli</i>	1,00E+06	CFU
60	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1,00E+06	CFU
61	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+06	CFU
62	<i>Legionella pneumophila</i>	1,00E+06	CFU
63	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06	CFU
64	<i>Neisseria meningitidis</i>	1,00E+06	CFU
65	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,00E+06	CFU
66	<i>Proteus mirabilis</i>	1,00E+06	CFU
67	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00E+06	CFU
68	<i>Serratia marcescens</i>	1,00E+06	CFU
69	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,00E+06	CFU
70	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06	CFU
71	<i>Chlamydomydia pneumoniae</i>	1,00E+06	IFU
72	<i>Clostridium bifermentans</i>	1,00E+06	CFU
73	<i>Clostridium scindens</i>	1,00E+06	CFU
74	<i>Clostridium novyi</i>	1,00E+06	CFU
75	<i>Clostridium septicum</i>	1,00E+06	CFU
76	<i>Clostridium difficile</i>	1,00E+06	CFU
77	<i>Clostridium perfringens</i>	1,00E+06	CFU
78	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,00E+06	CFU
79	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,00E+06	CFU
80	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00E+06	CFU
81	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,00E+06	CFU
82	<i>Proteus vulgaris</i>	1,00E+06	CFU
83	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,00E+06	CFU
84	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,00E+06	CFU
85	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1,00E+06	CFU
86	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1,00E+06	CFU
87	<i>Lactobacillus delbreukii</i>	1,00E+06	CFU
88	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1,00E+06	CFU
89	<i>Lactobacillus brevis</i>	1,00E+06	CFU
90	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,00E+06	CFU
91	<i>Streptococcus salivarius</i>	1,00E+06	CFU
92	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,00E+06	CFU

14.4 Interference

Testování interference bylo provedeno s použitím celkem 42 endogenních a exogenních potenciálně interferujících látek. Pozitivní vzorky při koncentraci 3×LoD a negativní vzorky byly pro každou látku testovány třikrát. U žádné z 34 látek uvedených níže nebyla pozorována interference.

Druh	Č.	Interferující látky	Testovaná koncentrace
Endogenní	1	Epinefrin	1 mg/mL
	2	Žaludeční šťáva	40% (obj./obj.)
	3	Lidský hemoglobin	10 mg/mL
	4	Lidská genomová DNA	0,004 mg/mL
	5	Mucin ze submaxilárních žláz skotu typu I-S	5% (obj./obj.)
	6	Kyselina šťavelová	0,0079 mg/mL
	7	Síra	0,01% (hm./obj.)
Exogenní	8	Albuterol-sulfát	0,0005 mg/mL
	9	Amoxicilin	0,0864 mg/mL
	10	Beklometason	0,034549 mg/mL
	11	Benzokain	12 mg/mL
	12	Budesonid	3 mg/mL
	13	Cetylpyridiniumchlorid	5 mg/mL
	14	Dexamethason	0,601 mg/mL
	15	Efedrin-hydrochlorid	1 mg/mL
	16	Ethambutol	0,03 mg/mL
	17	Eukalyptol	0,002 ul/mL
	18	Flunisolid	0,4 mg/mL
	19	Flutikason	0,005 mg/mL
	20	Formoterol	0,066 mg/mL
	21	Guaifenesin	5 mg/mL
	22	Isoniazid	0,06 mg/mL
	23	Levofloxacin	5 mg/mL
	24	Lidocain	12 mg/mL
	25	Mentol	5 mg/mL
	26	Methylsalicylát	0,6 ul/mL
	27	Mometason	0,000045 mg/dl
	28	Mupirocin	50 mg/mL
	29	NaCl (chlorid sodný)	50 mg/mL
	30	Nikotin	0,001 mg/mL
	31	Nystatin	20% (obj./obj.)
	32	Oseltamivir	0,000399 mg/mL
	33	Oxymetazolin	12 ng/mL
	34	Pentamidin isethionát	0,0003 mg/mL
	35	Fenylefrin (nosní sprej)	5 mg/mL
	36	Pyrazinamid	0,24 mg/mL
	37	Rifampin	0,048 mg/mL
	38	Streptomycin	0,258 mg/mL
	39	Olej z čajovníku	0,50% (obj./obj.)
	40	Theofylin	0,06 mg/mL
	41	Tobramycin	0,033 mg/mL
	42	Zanamivir	10 mg/mL

14.5 Konkurenční interference

K vyhodnocení potenciální vzájemné interference nebo inhibice v důsledku koinfekce byl proveden kompetitivní interferenční test. Nízké koncentrace ($3 \times \text{LoD}$) cílových kmenů MTBC byly smíseny s vysokými koncentracemi ($>1,00 \times 10^6 \times \text{CFU/mL}$) kmenů netuberkulózních mykobakterií (NTM). Každý smíšený vzorek byl testován třikrát. V důsledku toho byla u všech testovaných vzorků potvrzena 100% detekce a bylo ověřeno, že kvůli přítomnosti vysokých koncentrací NTM nedošlo k žádné vzájemné interferenci nebo inhibici. Pro tento test byly smíseny nízké koncentrace ($3 \times \text{LoD}$) cílových kmenů MTBC s vysokými koncentracemi ($>1,00 \times 10^6 \times \text{CFU/mL}$) kmenů netuberkulózních mykobakterií (NTM). Každý vzorek byl testován třikrát. Výsledky prokázaly, že nebyla pozorována žádná konkurenční interference.

Cílový kmen MTBC	Interferující organismus (NTM)	Míra detekce
MTB (H37Rv)	<i>M. avium</i>	3/3 (100%)
	<i>M. abscessus</i>	3/3 (100%)
	<i>M. intracellulare</i>	3/3 (100%)
	<i>M. Xenopi</i>	3/3 (100%)

14.6 Preciznost (opakovatelnost)

K vyhodnocení opakovatelnosti byla posouzena preciznost mezi šaržemi pomocí pozitivních vymyšlených vzorků při koncentracích $1 \times \text{LoD}$, $3 \times \text{LoD}$, $5 \times \text{LoD}$ a $7 \times \text{LoD}$, jakož i negativních vzorků. K vyhodnocení byly použity kmeny citlivé na *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* spolu s kmeny rezistentními na RIF a INH s příslušnými mutacemi, zředěné v každém sputu a sedimentu sputa.

Testování bylo provedeno jedním operátorem s použitím 1 šarže, a to po dobu celkem 20 dnů, s 2 běhy denně a 2 replikáty na jeden běh. Výsledky prokázaly, že všechna mezidenní a průběžná měření splňovala kritéria přijatelnosti se směrodatnou odchylkou (SD) $< 2,0$ a variačním koeficientem (CV) $< 5\%$, čímž se potvrdila opakovatelnost sady.

14.7 Preciznost (reprodukovatelnost)

K vyhodnocení reprodukovatelnosti byly testovány pozitivní vymyšlené vzorky při koncentracích $1 \times \text{LoD}$, $3 \times \text{LoD}$, $5 \times \text{LoD}$ a $7 \times \text{LoD}$ a dále negativní vzorky. K vyhodnocení byly použity kmeny citlivé na *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* spolu s kmeny rezistentními na RIF a INH s příslušnými mutacemi, zředěné v každém sputu a sedimentu sputa.

Testování bylo prováděno celkem 5 dní 3 operátory na různých testovacích místech s použitím 3 šarží, se 3 replikáty na jeden pokus a 2 pokusy denně. Výsledky prokázaly, že všechna mezilaboratorní, meziprovozní a měření šarží splňují kritéria přijatelnosti se směrodatnou odchylkou (SD) $< 2,0$ a variačním koeficientem (CV) $< 5\%$, čímž se potvrzuje reprodukovatelnost sady.

14.8 Klinický výkon

1) Sediment sputa

Toto hodnocení klinické funkce bylo zaslepenou, retrospektivní konfirmační studií provedenou za účelem posouzení detekce komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) a rezistence na antituberkulotika rifampicin (RIF) a isoniazid (INH), přičemž se používaly vzorky zbytkového sedimentu sputa od pacientů s podezřením na tuberkulózu.

Do hodnocení bylo zařazeno celkem 584 vzorků, z toho 375 MTBC-pozitivních a 209 MTBC-negativních. Z nich bylo 89 vzorků potvrzeno jako rezistentních vůči lékům, včetně 5 vzorků rezistentních vůči RIF a 84 vzorků rezistentních vůči RIF i INH. Všechny stavy MTBC positivity a lékové rezistence byly potvrzeny na základě výsledků testování mykobakteriální kultury a fenotypové citlivosti na léčivo.

(1) Detekce MTBC

Hodnocený prostředek (M10 MTB-RIF/INH)	Referenční výsledky	
	Pozitivní na MTBC	Negativní na MTBC
Pozitivní na MTBC	375	0
Negativní na MTBC	0	209
Celkem	375	209

- Klinická senzitivita: 100% (375/375) [95% CI: 99,02% – 100,00%]
- Klinická specifická: 100% (209/209) [95% CI: 98,25% – 100,00%]

(2) Detekce rezistence na RIF

Hodnocený prostředek (M10 MTB-RIF/INH)	Referenční výsledky	
	Rezistence na RIF	Citlivost na RIF
Rezistence na RIF	88	2
Citlivost na RIF	1	284
Celkem	89	286

- Klinická senzitivita: 98,88% (88/89) [95% CI: 93,90% – 99,97%]
- Klinická specifická: 99,30% (284/286) [95% CI: 97,50% – 99,92%]

(3) Detekce rezistence na INH

Hodnocený prostředek (M10 MTB-RIF/INH)	Referenční výsledky	
	Rezistence na INH	Citlivost na INH
Rezistence na INH	83	2
Citlivost na INH	1	289
Celkem	84	291

- Klinická senzitivita: 98,81% (83/84) [95% CI: 93,54% – 99,97%]
- Klinická specifická: 99,31% (289/291) [95% CI: 97,54% – 99,92%]

2) Sputum

Klinická výkonnost STANDARD M10 MTB-RIF/INH byla hodnocena pomocí uložených vzorků sputa, které byly odebrány pacientům s podezřením na plicní tuberkulózu zařazeným do studie FEND-Adult v letech 2022 až 2024. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 199 vzorků sputa. Jeden vzorek poskytl neurčitý výsledek detekce MTBC a byl vyřazen z výpočtů senzitivity a specifity.

Pro detekci komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) byl test hodnocen proti složenému mikrobiologickému referenčnímu standardu (MRS), který zahrnoval výsledky z kultury MGIT, kultury Löwenstein-Jensen a Xpert MTB/RIF Ultra získané 1. a 2. den sputa. Pro detekci rezistence na rifampicin (RIF) a isoniazid (INH) byl test hodnocen proti fenotypovému testování citlivosti na léky (pDST) jako referenčnímu standardu. U MTBC-pozitivních vzorků byla fenotypová léková rezistence identifikována u 11 vzorků s INH rezistencí a u 6 vzorků s RIF rezistencí, včetně 4 vzorků rezistentních jak na RIF, tak na INH (MDR-TB).

Citlivost a specifická byly odhadnuty pomocí neupravených jednoduchých proporcí a analýz, které byly upraveny podle země s intervaly spolehlivosti vypočtenými pomocí Wilsonova intervalu spolehlivosti.

Ve srovnání s MRS prokázala sada při detekci MTBC senzitivitu 98,6% (69/70) a specifickou 97,7% (125/128). Při detekci rezistence RIF vykazovala sada ve srovnání s pDST citlivost 100,0% (6/6) a specifickou 100,0% (58/58). Při detekci rezistence INH prokázala sada ve srovnání s pDST citlivost 81,8% (9/11) a specifickou 96,2% (50/52).

Citlivost a specifická odhadnutá pro STANDARD M10 MTB-RIF/INH

		n/N	Neupravený odhad	Wilsonův 95% IS	Upravený odhad	Wilsonův 95% IS
MTBC	Citlivost	69/70	98,6	(92,3, 99,7)	98,6	(87,8, 99,7)
	Specifická	125/128	97,7	(93,3, 99,2)	97,7	(93,3, 99,2)
RIF	Rezistence	6/6	100,0	(61,0, 100,0)	100,0	(61,0, 100,0)
	Citlivost	58/58	100,0	(93,8, 100,0)	100,0	(93,8, 100,0)
INH	Rezistence	9/11	81,8	(52,3, 94,9)	81,8	(41,7, 94,8)
	Citlivost	50/52	96,2	(87,0, 98,9)	96,2	(81,6, 98,9)

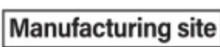
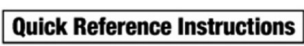
15. Omezení

- 1) Výkonnost cartridge byla ověřena pro nezpracované sputum a pro vzorky sedimentu sputa, které byly zkapalněny, dekontaminovány a koncentrovány pomocí NALC-NaOH. Použití jiných typů vzorků může vést k falešně pozitivním, falešně negativním nebo neplatným výsledkům.
- 2) Výsledek může být falešně negativní, pokud:
 - Koncentrace vzorku se blíží mezi detekce testu nebo je nižší.
 - Vzorek nebyl správně odebrán či přepravován nebo s ním bylo nesprávně manipulováno.
 - Vzorek obsahoval nedostatečné množství organismů.
 - Cartridge jsou vystaveny nevhodným faktorům z okolního prostředí (teplota/vlhkost).
- 3) K falešně pozitivním výsledkům může dojít z důvodu křížové kontaminace mezi vzorky pacientů, pomíchání vzorků a/nebo kontaminace DNA během manipulace s produktem.
- 4) Pozitivní výsledek naznačuje přítomnost cílové DNA MTBC. Klinická diagnóza a rozhodnutí o léčbě by však neměly být založeny pouze na výsledcích tohoto testu a měly by být interpretovány ve spojení s klinickými nálezy a dalšími laboratorními výsledky.
- 5) Tato sada pouze klasifikuje a identifikuje komplex *Mycobacterium tuberculosis*, který je multirezistentní (na rifampicin a isoniazid). Výsledky testu jsou určeny pouze ke klinickému použití. Ke klinické diagnostice a léčbě pacientů je třeba zvážit i příznaky/symptomy, anamnézu, další laboratorní testy a reakce na léčbu.
- 6) Potenciální mutace v cílových oblastech použití primeru nebo sond testu může mít za následek, že nedojde k detekci přítomnosti patogenu.
- 7) Tato cartridge neposkytuje definitivní potvrzení citlivosti na rifampicin nebo isoniazid, protože je možné, že mohou existovat mechanismy rezistence, které se liší od mechanismů zjištěných tímto zařízením a které jsou spojeny s nedostatečnou klinickou reakcí na léčbu. V případě vzorků, u kterých takové klinické podezření existuje, by mělo být zváženo další testování citlivosti na léčivo.
- 8) Překročení omezení objemu a/nebo odchylka od procedurálních kroků uvedených v části „11.1 Postup přípravy vzorku“ může vést k falešně pozitivním, falešně negativním nebo neplatným výsledkům.

16. Reference

- 1) Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. Centers for Disease Control and Prevention.
- 2) Kent, P. T., & Kubica, G. P. (1985). Public health Mycobacteriology a guide for the Level Iii Laboratory. U.S. Dep. of Health and Human Services.
- 3) Lawn, S. D., & Zumla, A. I. (2011). Tuberculosis. *The Lancet*, 378(9785), 57–72. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)62173-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)62173-3)
- 4) Ormerod, L. P. (2005). Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): Epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, 73-74(1), 17–24. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldh047>
- 5) Pang, Y., Lu, J., Wang, Y., Song, Y., Wang, S., & Zhao, Y. (2013). Study of the rifampin monoresistance mechanism in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 893–900. <https://doi.org/10.1128/aac.01024-12>
- 6) Riva, S., & Silvestri, L. G. (1972). Rifamycins: A general view. *Annual Review of Microbiology*, 26(1), 199–224. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.26.100172.001215>
- 7) Unissa, A. N., Subbian, S., Hanna, L. E., & Selvakumar, N. (2016). Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in mycobacterium tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 474–492. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>
- 8) Medecins Sans Frontieres(MSF) medical guidelines. (2022) Tuberculosis
- 9) World Health Organization. (2021). Tuberculosis (TB). World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- 10) World Health Organization. (2008). Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB).
- 11) CLSI EP17 A2; Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline Second Edition

17.Symbols

	Referenční číslo		Kód šarže
	Seznamte se s návodem k použití		Výrobce
	Vystačí na <n> testů		Datum výroby
	Upozornění		Udržujte v suchu
	Není určeno k testování v blízkosti pacienta		Skladujte mimo dosah slunečního záření
	Nepoužívejte opakovaně.		Nepoužívejte, pokud je obal poškozen
	Teplotní omezení		Spotřebujte do
	Zdravotnický prostředek pro in vitro diagnostiku		Tento produkt splňuje požadavky UK MDR 2002
	Označuje osobu odpovědnou ve Spojeném království		Označení CE – shoda s evropskou legislativou
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství		Katalogové číslo
	Obsah sady		Výrobní podnik
	Stručné referenční pokyny		Cartridge
	Roztok pro předběžnou úpravu sputa		Sonikační zkumavka

Další informace o
STANDARD M10
MTB-RIF/INH
získáte od
zástupce společnosti SD BIOSENSOR

L28MTHCZ4R0 / 2026.07



SD Biosensor, Inc.

C-4th&5th, 16, Deogyong-daero 1556beon-gil, Yeongtong-gu,
Suwon-si, Gyeonggi-do, 16690, REPUBLIC OF KOREA

Manufacturing site

14, Jeungpyeongsandan-ro, Jeungpyeong-eup,
Jeungpyeong-gun, Chungcheongbuk-do, 27915, REPUBLIC OF KOREA



MT Promedt Consulting Ltd.

c/o Critchleys LLP, First Floor, Park Central, 40-41 Park End
Street, Oxford OX1 1JD, United Kingdom
Phone | +44 1865 679004



MT Promedt Consulting GmbH

Ernst-Heckel-Straße 7 66386 St. Ingbert Germany



Pouze k *In Vitro* diagnostice



Jakékoli dotazy týkající se uvedených pokynů je třeba směřovat na adresu: ts@sdbiosensor.com nebo
můžete navštívit naše webové stránky www.sdbiosensor.com