



Urogenitální infekce a rezistence

(12 JAMEK) REF 87123 VER 01

Pro systém *HIGH-PLEX 24*

NÁVOD K POUŽITÍ



Tento uživatelský manuál čtete společně s manuálem pro systém *High-Plex 24*.

Počínaje Q1 2019, AusDiagnostics začíná postupně uvolňovat na trh nové reagenční stripy. Stripy s reagenčními jsou nedělitelné jednotky, které obsahují všechna činidla potřebná ke spuštění panelů testů AusDiagnostics a nahrazují samostatné zkumavky s mastermixem, olejem a vodou.

DŮLEŽITÉ: Stripy s reagenčními vyžadují nový reagenční blok a nový software. Pokud váš systém nebyl upgradován na nový reagenční blok, kontaktujte AusDiagnostics (viz oddíl Technické dotazy).

Obsah

1. VAROVÁNÍ A LIMITACE	4
2. DALŠÍ NUTNÉ INSTRUKCE	4
3. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ	5
4. CÍLOVÉ PATOGENY KITU	5
4.1 POPIS CÍLOVÝCH PATOGENŮ	6
Bakterie	6
Geny rezistence	6
Parazité	7
5. SLOŽKY KITU: MATERIÁL A SKLADOVÁNÍ	7
5.1 ZKUMAVKY KROKU 1	7
5.2 DESTIČKY KROKU 2	8
5.3 MASTER MIX	9
5.4 REAGENČNÍ STRIP	10
5.5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY	10
6. POŽADAVKY NA VZORKY	11
6.1 DRUH VZORKŮ A JEJICH OBJEM	11
6.2 VHODNÉ METODY EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN	11
6.3 VÝTĚROVÝ TAMPÓN	12
7. DALŠÍ MOŽNOSTI NASTAVENÍ MT TESTU	13
8. VÝSLEDKY	14
9. KONTROLY	14
9.1 POZITIVNÍ KONTROLA	14
9.2 NEGATIVNÍ KONTROLA	14
9.2 KONTROLA LIDSKÉ DNA A SPRÁVNOSTI ODBĚRU VZORKU	15
9.3 KONTROLA EXTRAKCE NUKLEOVÉ KYSELINY	15
9.4 KONTROLA INHIBICE VZORKU A FUNKCE PŘÍSTROJE	15
10. KLINICKÉ PARAMETRY TESTU	15
10.1 REPRODUKOVATELNOST A OPAKOVATELNOST	15
10.2 INTERFERUJÍCÍ ČINIDLA	15
10.3 ANALYTICKÁ SPECIFICITA	16
10.4 ANALYTICKÁ SENSITIVITA	16
10.5 KLINICKÁ ÚČINNOST	17
10.6 KLINICKÁ ÚČINNOST PRO PŘÍMÉ VZORKOVÁNÍ MOČI A VÝTĚROVÝCH TAMPÓNŮ	18
11. LIMITACE METODY	18
12. KONTAKT A SERVIS	20
13. SLOVNÍČEK SYMBOLŮ	21
14. REFERENCE	22

1. VAROVÁNÍ A LIMITACE

- **DŮLEŽITÉ:** Správná IVD je zaručena pouze v případě, že bude dodržen přesný postup práce, uvedený v této příručce.
- **DŮLEŽITÉ:** Nepoužívejte kit, pokud je některá jeho součást poškozena nebo je porušený jeho obal.
- **DŮLEŽITÉ:** Nepoužívejte součásti kitu z kroku 1 nebo z kroku 2 s různými katalogovými čísly, ani různých verzí.
- **DŮLEŽITÉ:** Nepoužívejte produkt po datu spotřeby.
- Se vzorky, které potenciálně obsahují lidské patogeny, zacházejte podle platných bezpečnostních předpisů, a podle těchto předpisů vzorky také likvidujte.
- Tento kit je navržen a optimalizován pouze pro systém *High-Plex 24*.
- Pro určené použití tohoto kitu je nezbytná správná laboratorní praxe. Pro další bezpečnostní informace, nahlédněte do našich příslušných bezpečnostních listů¹, které jsou dostupné online na stránce <http://www.ausdiagnostics.com/regulatory.html>
- Tento kit je navržen pro měření specifických sekvencí nukleových kyselin. Proto negativní výsledek nevylučuje možnost přítomnosti nezvyklých sekvenčních variant. Výsledek získaný pomocí tohoto kitu musí být hodnocen společně s klinickým hodnocením a dalšími diagnostickými postupy. Na negativní výsledek nelze pro účely definitivní diagnózy spoléhat. Zanedbání nebo zpoždění léčby infikovaných pacientů může vest až k jejich smrti, zvláště u imunokompromitovaných pacientů.

2. DALŠÍ NUTNÉ INSTRUKCE




Tento manuál obsahuje specifické informace o produktu Urinogenital and Resistance (urogenitální infekce a rezistence), které nejsou uvedeny v jiných manuálech.

Tento manuál musí být přečten společně s:

- manuálem pro systém *High-Plex 24* (Dokument 9150r12),
- manuálem pro mastermix (Dokument 40000r03) nebo reagenční strip (Dokument 40001-r01)
- manuálem pro syntetické pozitivní kontroly (Dokument 91001r06).
- manuálem pro použití eluční zkumavky pro výtěrový tampón (0,5 ml pufru) (Dokument 90200r05)

3. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Kit Urinogenital and Resistance (Urogenitální infekce a rezistence) (12 jamek) je navržen pro *in vitro* diagnostiku (IVD), provedenou dostatečně proškoleným a zkušeným personálem v kvalifikovaných laboratořích, ve kterých se používá systém *High-Plex 24* (REF 9150).

 Tyto testy využívají multiplexovou tandemovou polymerázovou řetězovou reakci (MT-PCR)² pro amplifikaci cílové DNA a/nebo RNA. Podrobnější popis principu této metody naleznete v manuálu pro systém *High-Plex 24*. Kit Urinogenital and Resistance (12 jamek) je navržen jako poloautomatický IVD test pro identifikaci patogenů v extraktech nukleových kyselin z příslušných typů vzorků. Typy vzorků, které je možno použít, naleznete v kapitole 6. Seznam patogenů, které lze detekovat pomocí tohoto kitu, naleznete v kapitole 4.

4. CÍLOVÉ PATOGENY KITU

Urinogenital and Resistance (12 jamek) REF 87123 VER 05

ARTG ID: 236377, CE 0123



Test	Cílový patogen
Chlamydia	<i>Chlamydia trachomatis</i> (zahrnuje všechny kmeny)
RUO: LGV	Lymphogranuloma venereum (zahrnuje všechny kmeny)
Gonorrhoeae*	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (opa J + opa H gen) (zahrnuje všechny kmeny)
RUO: FC428 Ceftriaxon R	Mozaika penA z <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (kmeny obsahující Mutace A311V)
M. genitalium	<i>Mycoplasma genitalium</i> (zahrnuje všechny izoláty)
Fluorochinolon R	Rezistence vůči fluorochinolonu <i>Mycoplasma genitalium</i>
Mgen 23S	Rezistence vůči makrolidům <i>Mycoplasma genitalium</i>
M. hominis	<i>Mycoplasma hominis</i> (zahrnuje všechny izoláty)
U. parvum	<i>Ureaplasma parvum</i> (sérotypy 1, 3, 6, 14)
U. urealyticum	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (sérotypy 2, 4, 5 a 7-13)
T. vaginalis	<i>Trichomonas vaginalis</i> (nezahrnuje kmen G3)
Lidská DNA	referenční gen pro kontrolu správnosti vzorku
SPIKE	umělá sekvence pro kontrolu testu

* Důležité: Test Gonorrhoeae detekuje geny opa J a opa H. Je-li přítomen pouze jeden, je nutný další test pro potvrzení *N. gonorrhoeae*. Přečtěte si prosím místní pokyny pro potvrzovací postupy *N. gonorrhoeae*.

DŮLEŽITÉ: *U. urealyticum*, *U. parvum* a *M. hominis* jsou podmíněně patogenní. Pozitivní výsledky by měly být vždy interpretovány s ohledem na klinické příznaky.

VAROVÁNÍ: Testy LGV a FC428 Ceftriaxon R jsou určeny pouze pro výzkumné účely (RUO), dokud nebudou získány dostatečné údaje o klinickém výkonu.

Tento výrobek je v souladu s regulačními požadavky pro zdravotnické prostředky IVD příslušných úřadů v Austrálii (ARTG 236377) a Evropské unie (CE 0123).

4.1 POPIS CÍLOVÝCH PATOGENŮ

Bakterie

Chlamydia trachomatis je nejčastější bakteriální příčinou sexuálně přenosných infekcí². Různé sérovary jsou spojeny s různými projevy onemocnění: sérovary A, B, Ba a C způsobují trachom; sérovary D-K způsobují urogenitální onemocnění; a sérovary L1, L2 a L3 jsou zodpovědné za venerický lymfogranulom (LGV)^{4,5}. Chlamydiový test a test LGV jsou určeny k detekci všech serovarů *C. trachomatis*.

DŮLEŽITÉ: Test LGV je určen pouze pro studii výkonnosti (PSO), dokud nejsou získány dostatečné údaje o účinnosti.

Neisseria gonorrhoeae je druhou nejčastěji přenosnou pohlavně přenosnou bakterií po *C. trachomatis*. Přesná diagnóza jak symptomatických, tak asymptomatických infekcí je rozhodující pro prevenci přenosu a vážnějších klinických projevů, jako je zánětlivé onemocnění pánve (PID) a neplodnost³. Testy *Gonorrhoeae* jsou navrženy tak, aby detekovaly všechny kmeny *N. gonorrhoea* nesoucí opa J a opa H geny.

DŮLEŽITÉ: Testy *Gonorrhoeae* detekují geny opa J a opa H. Pokud je přítomen pouze jeden, je nutný další test pro potvrzení *N. gonorrhoeae* (viz Smith, et al., (2005) o pokynech pro detekci *Gonorrhoeae* v Austrálii)⁶. Přečtěte si prosím místní pokyny pro potvrzení *N. gonorrhoeae*.

Mycoplasma genitalium patří do třídy *Mollicute*. Jedná se o sexuálně přenosnou infekci, která má významnou morbiditu u mužů a žen, a zároveň je kofaktorem přenosu HIV⁹. Test *M. genitalium* je určen k detekci *M. genitalium*.

Mycoplasma hominis je bakterie třídy *Mollicute*, což jsou oportunistické patogeny často spojené s asymptomatickými zdravými osobami. Kolonizace mykoplazmat je spojena se zvýšeným rizikem vývoje těhotenských komplikací a dalších patogenních stavů včetně uretritidy a zánětlivého onemocnění pánve PID⁷. Test *M. hominis* detekuje všechny známé izoláty *M. hominis*.

Ureaplasma urealyticum a *Ureaplasma parvum* jsou třídy *Mollicute* nacházející se v dolním urogenitálním traktu mužů a žen⁸. Kolonizace bakteriemi *Ureaplasma* je spojena se zvýšeným rizikem těhotenských komplikací a neonatálních infekcí⁷. Test *U. parvum* je určen k detekci *U. parvum* (včetně serovarů 1, 3, 6 a 14) a test *U. urealyticum* je určen k detekci *U. urealyticum* (včetně sérovarů 2, 4, 5 a 7 až 13).

Geny rezistence

Klon *Neisseria gonorrhoeae* FC428 rezistentní na **ceftriaxon** byl poprvé pozorován v Japonsku v roce 2015 a v roce 2017 byl dokumentován v Dánsku, Kanadě a Austrálii. Klon FC428 obsahuje penA alelu, označenou na základě výsledků typizace sekvence *N. gonorrhoeae* jako PenA-60.001 a která kóduje změny včetně A311V a T483S, které byly u *N. gonorrhoeae* již dříve asociovány s rezistencí na ceftriaxon. Testy pro detekci tohoto klonu používají primery navržené proti alele PenA-60.001 a mutaci A311V. Stav rezistence se určuje porovnáním koncentrace FC428-ceftriaxonového markeru (vypočteno pomocí softwaru MT-PCR Results) se specifickými markery *Neisseria gonorrhoeae* opaJ a opaH¹⁰.

Testy na rezistenci na **makrolidy** a **fluorochinolony** *Mycoplasma genitalium* jsou navrženy tak, aby amplifikovaly sekvence divokého typu (tj. nemutované sekvence, gen 23S pro rezistenci na makrolidy, nebo parC gen pro rezistenci na fluorochinolony). Kmeny obsahující mutace spojené s rezistencí v těchto oblastech (A2058 nebo A2059 pro 23S, S83 nebo D87 pro parC) jsou amplifikovány s nižší účinností. Porovnání koncentrací vypočtených pomocí softwaru MT-PCR Results pro každý z těchto cílů markerem jinde v genomu *Mycoplasma genitalium* umožňuje specifickou identifikaci mutantních kmenů, a tedy predikci stavu rezistence¹¹.

Parazité

Trichomonas vaginalis je jednobuněčný parazitický prvek a je nejčastější nevírovou příčinou sexuálně přenosných infekcí. V roce 2008 bylo odhadováno celosvětově 276,4 milionu nových případů *T. vaginalis* u dospělých³. Přibližně 80 % detekcí *T. vaginalis* u žen pochází od asymptomatických pacientů. Test *T. vaginalis* je určen k detekci všech kmenů *T. vaginalis* kromě G3.

5. SLOŽKY KITU: MATERIÁL A SKLADOVÁNÍ

Poznámka: Žádné reagenty AusDiagnostics neobsahují nebezpečné látky uvedené v nařízení (ES) č. 1272/2008¹ či v klasifikaci GHS.

Název kitu	Složky kitu	REF	GTIN
Urinogenital and Resistance (12 jamek)			
	- Step1 Tubes = zkumavky kroku 1	87123S	9343044002861
	- Step 2 Plates = destičky kroku 2	87123P	9343044002854
	- Low DNA Mastermix zkumavky nebo	40230DNA	9343033001178
	- Low DNA reagenční stripky	40231DNA	9343044003080

5.1 ZKUMAVKY KROKU 1

Zkumavky kitu Urinogenital and Resistance (12 jamek) obsahují zkumavky pro 96 vzorků.

Materiál	Štítek	Popis	Funkce	Množství
Zkumavky pro krok 1	STEP1 TUBES	1×samostatně balený sáček obsahující 12×8 jamkových stripů s vysušenými oligonukleotidy	Nádobka pro multiplexovou PCR kroku 1	96








INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

DŮLEŽITÉ: Zkumavky kroku 1 s fóliovými víčky (síly) vyžadují před použitím instalaci nového typu víčka cyklieru. Kontaktujte naše servisní středisko, pokud jste ještě neustoupili od starého víčka cyklieru. Tyto zkumavky mohou být skladovány při teplotě 14 – 29 °C.

Expirace produktu je 6 měsíců od data uvedeného na štítku.

5.2 DESTIČKY KROKU 2

Obsah této krabičky kitu Urinogenital and Resistance (12 jamek) postačí pro 288 vzorků.



Materiál	Štítek	Popis	Funkce	Množství
Krabička na destičky kroku 2	STEP 2 PLATES	Vnější obal	Ochrana	1
Destička kroku 2	STEP2PLATE	Pouzdro s 384 -jamkovou destičkou s vysušenými oligonukleotidy pro krok 2	Nádobka pro PCR kroku 2	12
Zkumavka s vodou		2,0ml zkumavka s 1,5 ml vody s modrým víčkem	Ředění master mixu a vzorků	36
Zkumavka s olejem		2,0ml zkumavka s 0,7 ml minerálního oleje se zeleným víčkem	Zabraňuje vypařování reagentů z kroku 1	36
Destička na ředění		Prázdná, 96-jamková destička	Ředění pro krok 2	12
Zkumavka na odpad		5ml prázdná zkumavka s bílým víčkem	Pro deaktivaci DNA/RNA bělidlem	6
Sáčky na použité špičky		Sáčky se zipovým uzávěrem	Bezpečný sběr použitých špiček	6



INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

DŮLEŽITÉ: Před vybalením produktu z obalu se ujistěte, že je sáček s desikantem (silikagelem) neporušený. Nepoužívejte sadu, pokud je desikant znehodnocen nebo chybí. Tyto destičky mohou být skladovány při teplotě 14 – 29 °C. Expirace produktu je 6 měsíců od data uvedeného na štítku.

5.3 MASTER MIX

Štítek krabičky s Master mixem	Materiál	Značka	Popis	Objem	Množství
LOW DNA MASTER MIX REF 40230DNA	Step1 Low DNA		0,5ml zkumavka se žlutým víčkem. Obsahuje enzymy v pufru pro reakci kroku 1.	120 µl	10
Nepoužívat opakovaně!!!	Step 2 Low DNA		1,5ml zkumavka s červeným víčkem. Obsahuje enzymy v pufru pro reakci kroku 2.	1000 µl	10

INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ PRODUKTU A ZACHÁZENÍ S NÍM



VAROVÁNÍ: Master mix je dodáván zmrazený. Pokud dojde během dodávky k jeho rozmrazení, nepoužívejte jej a kontaktujte naši firmu.

VAROVÁNÍ: Reakce musí být zahájena do 30 minut po rozmrazení master mixu. Master mix je určen pouze na jedno použití. Nepokoušejte se master mix opětovně zamrazovat.



VAROVÁNÍ: Nepoužívejte reagenty opakovaně a likvidujte je podle platných předpisů. Dodaný master mix skladujte v originálním obale při teplotě nižší než $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 REAGENČNÍ STRIP

Štítek krabičky	Materiál	Popis
LOW DNA REAGENT CASSETTE REF 40231DNA	Step1 DNA Mastermix	Pufr s enzymy pro reakci kroku 1.
	Step2 DNA Mastermix	Pufr s enzymy pro reakci kroku 2.
Nepoužívat opakovaně!!!	Voda	Na ředění mastermixu a vzorků.
	Olej	Zabraňuje vypařování reagencií z kroku 1

POKYNY PRO SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

DŮLEŽITÉ: Reagenční stripy vyžadují, aby byl v procesoru nainstalován nový reagenční blok. Pokud doposud nemáte svůj přístroj v této novější verzi, kontaktujte AusDiagnostics.

VAROVÁNÍ: Reagenční stripy mohou dorazit rozmrazené. To neovlivní výkon stripů s reagenциemi. Po příjezdu okamžitě uložte stripy s reagenциemi pod -20 °C.

VAROVÁNÍ: Běh musí být spuštěn do 30 minut od rozmrazení stripu s činidlem. Reagenční stripy jsou určeny pouze pro jedno použití. Stripy s reagenциemi znovu nezmrazujte.

Poznámka: Před jemným převrácením a odstředováním dbejte na úplné rozmrazení stripů s reagenциemi, protože zmrazené reagenциe mohou proniknout těsněním fólie.

Poznámka: Nepoužívejte stripy s reagenциemi opakovaně. Zlikvidujte je podle příslušných bezpečnostních postupů. Expirace produktu je uvedena na štítku

5.5 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Požadovaný materiál, který není automatickou součástí dodávky, je tento:

- Prostředky osobní ochrany
- Bělidlo s 0,4 % aktivního chlóru (4 ml na každý run)
- Nastavitelné pipety bez nukleáz
- Sterilní špičky s filtrem bez nukleáz

6. POŽADAVKY NA VZORKY

6.1 DRUH VZORKŮ A JEJICH OBJEM

S tímto kitem lze použít takový extrakt nukleových kyselin, který je vhodný pro PCR.

Přípustné typy vzorků zahrnují genitální výtěry, vaginální výtěr, uretrální výtěr, endocervikální výtěr, rektální výtěr, výtěr z úst, výtěry z lézí, očí a kůže, dále moč a sperma.

M. hominis, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *Chlamydia* a *T. vaginalis* mohou být přímo detekovány bez extrakce nukleových kyselin z eluátů vaginálních, endocervikálních a uretrálních výtěrů. (Viz část 6.3).

Poznámka: Uložte svůj extrakt nukleové kyseliny do zkumavek bez inhibitorů PCR a nukleáz.

Při práci s vzorky RNA je třeba použít standardní opatření k minimalizaci degradace RNA. Objem vzorku přidaného do zkumavky kroku 1 musí být 10 µl.

Vždy se vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčními, podle zásad správné laboratorní praxe.

6.2 VHODNÉ METODY EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN

Manuální extrakce a pipetování extraktů nukleových kyselin do zkumavek kroku 1 provádějte v biohazardním boxu.

Následující manuální a automatizované metody extrakce nukleových kyselin byly ověřeny zákazníky společnosti AusDiagnostics a jsou považovány za vhodné pro produkci extraktů nukleových kyselin kompatibilních s kitem Urinogenital and Resistance (12 jamek).

Extrakční systém	Typ
AusDiagnostics MT-Prep Extractor	Automatický
Abbott 2000	Automatický
bioMerieux NucliSENS easyMAG	Automatický
PerkinElmer chemagic prepito-D	Automatický
PerkinElmer JANUS	Automatický
Qiagen QIA Symphony	Automatický
Qiagen EZ1	Automatický
Qiagen QIAcube	Automatický
Roche Cobas 4800	Automatický
Roche High Pure series	Manuální
Roche MagNA Pure series	Automatický

6.3 VÝTĚROVÝ TAMPÓN

Pokud je to klinicky vhodné, může být tato souprava použita přímo s eluátem z tampónu, buď suchého nebo ve virovém transportním médiu, v kombinaci se zkumavkou Swab Elution Tube (0,5 ml pufru) (REF 90220).

Příprava výtěru s použitím Swab Elution Tube (0,5 ml pufru) (REF 90220) byla schválena pro použití s tampóny a transportními médii společnosti Copan and Ditch. Před vlastním odběrem, transportem a zpracováním vzorku si přečtěte příslušné návody k použití.

7. DALŠÍ MOŽNOSTI NASTAVENÍ MT TESTU

Tuto kapitolu je třeba číst společně s návodem k použití k systému *High-Plex 24*, konkrétně kapitolou 7.3. Dodatečné možnosti nastavení software jsou tyto:

Pipetování: Tabulka níže vysvětluje možnosti dostupné u robotického pipetování.

Možnosti pipetování	Popis
Manuál pipetting into tube strip	Extrakty nukleových kyselin byly pipetovány manuálně do zkumavek kroku 1 (Step 1) před spuštěním runu. Není tedy vyžadováno robotické pipetování.
Robot sampling from 5 ml tubes	Vzorky eluované do zkumavky Swab Elution Tube (0,5 ml pufry, REF 90220) jsou načteny do bloku automatického vzorkování pro robotické vzorkování. Minimální objem 500 µL
Robot sampling from 2 ml tubes	Extrakty nukleových kyselin umístěné v 2ml zkumavkách jsou naneseny do bloku pro robotické pipetování. Minimální objem je 40 µl.
Robot sampling from 1.5 ml flip-cap tubes	Extrakty nukleových kyselin umístěné v 1,5 ml zkumavkách jsou naneseny do bloku pro robotické pipetování.
Robot sampling from 96 well plate samples 1-24	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 1 - 24. Minimální objem je 40 µl.
Robot sampling from 96 well plate samples 25-48	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 25 - 48. Minimální objem je 40 µl.
Robot sampling from 96 well plate samples 49-72	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 49 - 72. Minimální objem je 40 µl.
Robot sampling from 96 well plate samples 73-96	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 73 - 96. Minimální objem je 40 µl.

8. VÝSLEDKY

VAROVÁNÍ: IVD požadavky na výkonnost kitu nepovolují žádné změny výsledku provedené uživatelem (tj. „**Reject**/Odmítnout“ nebo „**Confirm**/Potvrdit“ výsledek). Jakékoli změny provedené uživatelem budou jasně uvedeny v závěrečné zprávě.

Křivky detekce patogenu jsou zobrazeny v softwaru MT Analysis. Na základě předdefinovaných parametrů software označí cíl jako „**Present**/přítomen“, „**Check**/zkontrolovat“ nebo „**Blank**/není detekován“. Neopomeňte možnost mnohonásobné infekce. Koncentrace cílové molekuly, vyjádřené jako libovolné jednotky, se počítají vzhledem k vnitřní kontrolní SPIKE, ve které se amplifikuje známé množství cílových molekul. Protože se koncentrace SPIKE neměří, jsou tyto hodnoty v libovolných jednotkách. Navíc v některých panelech lze relativní koncentraci každého cíle odvodit z normalizovaného procenta (zobrazeného v závorkách po označení „**Present**“).

U cílů LGV, ceftriaxonové rezistence, fluorochinolonové rezistence a macrolidové rezistence software výsledků identifikuje predikovaný fenotyp na základě relativních koncentrací těchto cílů k jiným markerům v genomu příslušného organismu (*Chlamydia* pro LGV, *Neisseria gonorrhoeae* pro rezistenci k ceftriaxonu a *Mycoplasma genitalium* pro rezistenci vůči fluorochinolonům a makrolidům).


Výsledky pro tyto cíle jsou zobrazeny v okně Diagnostika/**Diagnostics** v tabulce Výsledky/**Results** a jsou nezávislé na označení „**Present**“.


Další podrobnosti o analýze výsledků naleznete v IFU systému High-Plex (oddíl 11. Interpretace výsledků softwaru).

DŮLEŽITÉ: Relevantní výsledky oznamujte státnímu nebo místnímu odboru veřejného zdraví.

9. KONTROLY

9.1 POZITIVNÍ KONTROLA

 Doporučujeme zahrnout pozitivní kontroly do každého runu. Postupujte podle jednotlivých laboratorních postupů. Selhání pozitivní kontroly by mělo vést k přehodnocení všech negativních výsledků získaných od posledního runu s kontrolou.

 Syntetické pozitivní kontroly pro sexuálně přenosné nemoci a herpes (REF 91021) obsahují všechny cílové sekvence pro kit Urinogenital and Resistance (12 jamek). Před jejich použitím si přečtěte příložený uživatelský manuál.

9.2 NEGATIVNÍ KONTROLA

Doporučujeme, aby podle příslušných laboratorních postupů byla provedena negativní kontrola. Amplifikace negativní kontroly znamená kontaminaci pracovního prostředí (ke kterému může dojít např. při manipulaci během instalace nebo při rozliti vzorku na desku MT procesoru). V takovém případě otřete povrch desky MT procesoru (včetně víka termocykleru) nekorozivním činidlem denaturujícím nukleové kyseliny (např. DNA-OFF™) a potom jej ošetřete UV zářením. Příslušné vzorky by měly být znovu testovány.

NEPOUŽÍVEJTE PRO ČIŠTĚNÍ NÁSTROJE BĚLIDLO.

9.2 KONTROLA LIDSKÉ DNA A SPRÁVNOSTI ODBĚRU VZORKU


Kontrola *Human DNA Control* se zaměřuje na referenční gen lidské DNA, který indikuje přítomnost lidské DNA v extraktu nukleové kyseliny nebo přímo ve vzorku. Není-li detekován žádný cíl a v testu kontroly vhodnosti vzorků, nebo v testu kontroly lidské DNA nedojde k amplifikaci, nelze na výsledky spoléhat. Za těchto okolností AusDiagnostics doporučuje opakované testování nového extraktu nebo vzorku.

9.3 KONTROLA EXTRAKCE NUKLEOVÉ KYSELINY

Je odpovědností uživatele zajistit, aby byl zaveden vhodný postup extrakce nukleových kyselin. Doporučujeme, aby byla do každého extrakčního běhu zařazena známá pozitivní kontrola. Není-li kontrola extrakce nukleové kyseliny detekována, nemůžeme se spoléhat na negativní výsledky. Doporučujeme, aby byl jakýkoli vzorek s negativní kontrolou extrakce nukleových kyselin znovu odebrán a případně znovu extrahován a analýza byla opakována.

9.4 KONTROLA INHIBICE VZORKU A FUNKCE PŘÍSTROJE

SPIKE je zcela umělá sekvence, která je přítomna ve zkumavkách kroku 1 pro sledování inhibice vzorků a výkonu přístroje. SPIKE byl navržen tak, aby neměl křížovou reaktivitu s diagnostickými cíli nebo testy. Pokud dochází k inhibici SPIKE, pak to naznačuje, že vzorek obsahuje inhibiční látky nebo že reakční podmínky nejsou optimální. V tomto případě doporučujeme, aby byl vzorek znovu extrahován a analýza byla opakována.

 Další podrobnosti o analýze SPIKE naleznete v manuálu k systému *High-Plex 24* (kapitola 9.2).

10. KLINICKÉ PARAMETRY TESTU

10.1 REPRODUKOVATELNOST A OPAKOVATELNOST


Reprodukovatelnost testů systému *High-Plex 24* byla hodnocena testováním pěti vzorků na třech šaržích během tří dnů (s každou šarží testovanou jednou denně) a třemi systémy se třemi operátory. Byl vypočítán variační koeficient (CV) pro výsledné střední hodnoty Ct pro každý ze vzorků. Bylo zjištěno, že hodnoty Ct pro všechny vzorky ve všech koncentracích byly vysoce reprodukovatelné s hodnotami CV v rozmezí 2,08 % až 4,86 %, v průměru 3,40 %.

Opakovatelnost testů na systému *High-Plex 24* byla hodnocena testováním pěti vzorků na třech šaržích, přičemž jedna šarže byla testována třikrát denně na jednom systému. Bylo zjištěno, že hodnoty Ct pro všechny vzorky ve všech koncentracích byly vysoce opakovatelné s hodnotami CV v rozmezí od 2,26 % do 5,11 %, v průměru 3,84 %.

Nízký variační koeficient vyplývající z těchto studií poskytuje důkaz, že systém *High-Plex 24* je vhodný pro IVD použití.

10.2 INTERFERUJÍCÍ ČINIDLA

Testovali jsme řadu exogenních a endogenních látek na potenciální rušení PCR. V důsledku přítomnosti kterékoli testované látky nebyla pozorována žádná nebo jen minimální interference. Přítomnost interní kontroly SPIKE ve všech produktech AusDiagnostics kontroluje v každém vzorku možné rušení PCR.

 Další podrobnosti o interferujících látkách naleznete v manuálu k systému *High-Plex 24* Systém (viz kapitola 13.1).

10.3 ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Jako součást klinických validací cílových sekvencí byla hodnocena křížová reaktivita primerů s necílovými patogeny.

Rezistence na makrolidy a fluorochinolony se hodnotí porovnáním vypočtených koncentrací těchto cílů vzhledem ke specifickému markeru *Mycoplasma genitalium*. Ve vzorcích obsahujících vysoké koncentrace jiných cílů na panelu (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *U. urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*) ani u negativních vzorků obsahujících normální vaginální flóru nebyla pozorována žádná zkřížená reakce těchto markerů rezistence.

10.4 ANALYTICKÁ SENSITIVITA

Mez detekce (LoD) byl stanovena pomocí sériového zředění plazmidů s multiplexovou amplifikací kroku 1 a s 16 replikáty na testované ředění. Hodnota LoD byla stanovena jako nejnižší koncentrace, která vykazovala 100% amplifikaci cílové sekvence. Rozsahy se používají tehdy, když vzorky s vyššími koncentracemi nebyly detekovány, zatímco u vzorků s nižšími koncentracemi došlo ke 100% amplifikaci. Výpočet LoD je uveden jako počet kopií na 10 μ l vzorku i jako počet kopií na ml původního vzorku. Výpočet kopií/ml ve vzorku je založen na 100% účinné extrakci nukleové kyseliny, která koncentruje 200 μ l vzorku do 50 μ l eluátu.

Test	LoD (kopie/ μ l)	LoD (kopie/ml)
Chlamydia	16 -41	400 - 1025
RUO: LGV	2-3	50-75
Gonorrhoeae (opaJ) *	6 -16	150 - 400
Gonorrhoeae (opaH)*	8-13	200-325
RUO: FC428 Cefriaxon R	91-114	2275-2850
T. vaginalis	22	550
U. urealyticum	11 - 28	275 - 700
M.hominis	2 - 33	50 - 825
U. parvum	12 - 30	300 - 750
M. genitalium	38	950
Fluoroquinolone R	104-130	2600-3250
Mgen23S	2-31	50-775

*Hodnota LoD těchto cílových patogenů byla určena nezávisle (tj. ne v kombinovaném testu)

10.5 KLINICKÁ ÚČINNOST

Klinická účinnost pro cílové sekvence používané v tomto kitu byla hodnocena v mnoha klinických laboratořích v Austrálii a v Evropě. Alternativní metoda každé instituce byla považována za referenční metodu pro toto hodnocení.

Test	SENSITIVITA % (95% interval spolehlivosti)	SPECIFICITA % (95% interval spolehlivosti)
Chlamydia	96,8 (96,5-98,5)	100,0 (99,2-100,0)
RUO: LGV *	Pouze pro výzkumné účely	
Gonorrhoeae (opaJ opaH)	97,7 (93,7-99,3)	99,7 (98,9-99,9)
Gonorrhoeae (opaJ)	97,2 (93,2-98,9)	99,9 (99,1-100,0)
Gonorrhoeae (opaH)	91,7 (84,5-95,9)	99,7 (98,1-100,0)
RUO: FC428 CeftriaxoneR *	Pouze pro výzkumné účely	
T.vaginalis	100,0 (85,0 - 100,0)	100,0 (94,7 - 100,0)
M.hominis	91,4 (80,2-96,8)	98,7 (96,5-99,5)
U.parvum	97,6 (93,6-99,2)	96,4 (92,5-98,4)
U.urealyticum	94,2 (85,1-98,1)	97,2 (94,1-98,8)
M.genitalium	100,0 (95,2 - 100,0)	100,0 (97,3 - 100,0)
Mutace spojené s rezistencí na fluorochinolony	100,0 (90,0 - 100,0)	100,0 (79,1 - 100,0)
Mutace spojené s rezistencí na makrolidy **	92,5 (80,9-97,6)	93,3 (66,0-99,7)

* Tyto testy byly ověřeny pomocí <20 potvrzených pozitivních vzorků. Během návrhu primeru pro každý test se provádí bioinformatická analýza, při které se analyzuje cílová sekvence primerů ve všech veřejně dostupných sekvencích. Tato analýza je založena na publikovaném výzkumu a interních studiích o významu jakýchkoli nesouladů v sekvenci primerů na efektivitu qPCR. To poskytuje důkaz, že testy AusDiagnostics by měly detekovat všechny stanovené cílové sekvence, a proto lze spoléhat na testy validované s malým počtem potvrzených vzorků.

** Falešně negativní vzorky pro tento test byly vynechány také srovnávací CE metodou. Byly osekvenovány.

Následující testy jsou určeny pouze pro výzkumné účely (RUO): LGV, FC428 Ceftriaxon R.

10.6 KLINICKÁ ÚČINNOST PRO PŘÍMÉ VZORKOVÁNÍ MOČI A VÝTĚROVÝCH TAMPÓNŮ

Klinická účinnost pro cílové sekvence používané v tomto produktu byla hodnocena v mnoha klinických laboratořích v Austrálii a v Evropě. Alternativní metoda každé instituce byla považována za referenční metodu pro toto hodnocení.

Test	SENZITIVITA % (95% interval spolehlivosti)	SPECIFICITA % (95% interval spolehlivosti)
Chlamydia	88.5 (75.9-95.2)	100.0 (82.2-100.0)
Gonorrhoeae (opa) *	100,0 (ze 2 pozitivních vzorků)	100,0 (88,3-100,0)
T.vaginalis *	100.0 (ze 4 pozitivních vzorků)	100.0 (87,7-100,0)
M.hominis *	100.0 (z 15 pozitivních vzorků)	100.0 (90,8-100,0)
U.parvum	100,0 (85,4-100,0)	100,0 (85,4-100,0)
U.urealyticum *	100.0 (ze 7 pozitivních vzorků)	100,0 (86,7-100,0)

* Tyto testy byly validovány <20 potvrzenými pozitivními vzorky. Během návrhu primerů pro každý test se provádí bioinformatická analýza, při které se cílová sekvence primerů analyzuje ve všech veřejně dostupných sekvencích. Tato analýza je založena na publikovaných výzkumech a interních studiích o významu jakýchkoli neshod v sekvenci primerů o účinnosti qPCR. To poskytuje důkaz, že testy AusDiagnostics by měly detekovat všechny určené cíle, a proto se lze spolehnout na testy validované s nízkým počtem potvrzených vzorků.

11. LIMITACE METODY

- Tento produkt smí používat pouze kvalifikovaný personál v kvalifikovaných laboratořích.
- Výkony kitu Urinogenital and Resistance (12 jamek) byly stanoveny pouze u systémů High-Plex 24.
- Testy v tomto produktu neposkytují kvantitativní hodnoty pro patogen(y) ve vzorku.
- Provedení testu bylo hodnoceno pro použití pouze s materiálem pro lidské vzorky.
- Provedení tohoto testu bylo potvrzeno pouze pomocí extraktů nukleových kyselin z následujících typů vzorků: výtěry z genitálií, vaginální výtěry, výtěry z močové trubice, endocervikální výtěry, výtěry z konečníku, výtěry z úst, výtěry z lézí, z očí a kůže, dále z moči a spermatu.

M. hominis, *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *U. parvum* a *Chlamydia* lze detekovat přímo, bez extrakce nukleových kyselin, z eluátů vaginálních, endocervikálních a uretrálních výtěrů. Nebylo ověřeno pro použití s jinými typy vzorků.

- Provedení tohoto testu nebylo stanoveno u pacientů bez příznaků infekčních agens genitálií.
- Provedení tohoto testu nebylo stanoveno u imunokompromitovaných jedinců.
- Panel Urinogenital and Resistance (12 jamek) je určen k měření specifických sekvencí nukleových kyselin.

Negativní výsledek tedy nevylučuje možnost, že je přítomna neobvyklá varianta sekvence.

Výsledky získané s tímto přípravkem by měly být použity ve spojení s informacemi dostupnými z klinických hodnocení a dalších diagnostických postupů. Na negativní výsledek nelze spoléhat jako na definitivní diagnózu. Neúspěch nebo zpoždění léčby infikovaného pacienta může vést k úmrtí, přičemž imunokompromitovaní pacienti jsou vystaveni nejvyššímu riziku.

- Detekce nukleových kyselin závisí na správném odběru vzorků, manipulaci, přepravě, skladování a přípravě (podle pokynů výrobce zařízení pro odběr vzorků). Nedodržení správných postupů může vést k nesprávným výsledkům.
- Testy Gonorrhoeae detekují opa J a opa H geny, a pokud je přítomen pouze jeden z těchto genů, je nutný potvrzovací test *N. gonorrhoeae*⁶. Postupy pro potvrzení *N. gonorrhoeae* naleznete v místních pokynech.
- **DŮLEŽITÉ:** *U. urealyticum*, *U. parvum* a *M. hominis* jsou podmíněně patogenní. Pozitivní výsledky by měly být vždy interpretovány s ohledem na klinické příznaky.
- **VAROVÁNÍ:** Testy LGV a FC428 Ceftriaxon R jsou prozatím určeny pouze pro výzkumné účely (RUO), dokud nebudou k dispozici dostatečné údaje o jejich klinickém výkonu.

12. KONTAKT A SERVIS

Další pokyny a řešení potíží najdete v manuálu k systému High-Plex 24 Systém (část 14).

Pokud potřebujete pomoc nebo se objeví nějaké problémy, kontaktujte naše servisní středisko:

Mgr. Jiří Smutný










Tel.: +420 601 394 077

Email: smutny@biovendor.cz, www.biovendor.cz

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

13. SLOVNÍČEK SYMBOLŮ

	Katalogové číslo
	Číslo verze
LOT	Šarže
GTIN	Tento produkt má přiřazeno jedinečné číslo Global Trade Item Number.
	IVD ARTG Označuje, že příslušný výrobek je určen pro diagnostické použití <i>in vitro</i> v Austrálii a je zařazen do australského registru terapeutických výrobků (ARTG).
	IVD CE Označuje, že příslušný výrobek je určen pro diagnostické použití <i>in vitro</i> v Evropském hospodářském prostoru a je v souladu s evropskou směrnicí IVD 98/79 / EC.
	VAROVÁNÍ Přečtěte si pozorně příslušnou část.
	Před použitím si přečtěte příslušné pokyny pro použití
	Teplotní rozsah pro skladování
	Teplotní rozsah pro skladování (pouze horní limit)
	Pozitivní kontrola
VAROVÁNÍ	Upozorňuje uživatele na situace, které by v případě, že se jim nepodaří předejít, mohly vést k nebezpečí nebo jiným závažným nepříznivým důsledkům používání zařízení
DŮLEŽITÉ	Upozorňuje uživatele na zvláštní péči nebo zvláštní činnosti, nezbytné pro bezpečné a efektivní používání zařízení.
Poznámka	Další informace

14. REFERENCE

1. Parliament, E., Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (Text with EEA relevance), in 1272. 2008.
2. Stanley, K.K. and E. Szewczuk, Multiplexed tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBRGreen detection. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(20): p. e180.
3. Organisation, W.H. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. 2012 [cited 2015 October]; Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/>.
4. Stothard, D.R., et al., Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three diseasecausing groups of *Chlamydia trachomatis*. 2003. 71(3): p. 1200-1208.
5. Stark, D., et al., Lymphogranuloma venereum in Australia: anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. 2007. 45(3): p. 1029-1031.
6. Tapsall, J., G. Lum, and D. Smith, Guidelines for the use and interpretation of nucleic acid detection tests for *Neisseria gonorrhoeae* in Australia: a position paper on behalf of the Public Health Laboratory Network. *Communicable diseases intelligence quarterly report*, 2005. 29(4): p. 358.
7. England, P.H. Detection and carriage of group B Streptococci. 2015 [cited 2015 October]; Available from: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-58-processing-swabs-for-group-bstreptococcal-carriage>.
8. Waites, K.B., B. Katz, and R.L.J.C.m.r. Schelonka, Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. 2005. 18(4): p. 757-789. 87123-r01 Instructions For Use February 2019 Page 18 of 18
9. Plecko, V., et al., *Mycoplasma genitalium*: clinical significance and diagnosis. 2014. 21(4): p. 1-0.
10. Whiley, D.M., et al., Direct Detection of penA gene Associated with Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* FC428 Strain by Using PCR. 2018. 24(8): p. 1573.
11. Shimada, Y., et al., Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance. 2010. 36(3): p. 255-258.

15. PUBLIKACE

Uveřejněné publikace, které popisují experimenty používající produkty AusDiagnostics naleznete na stránce <https://www.ausdiagnostics.com/publications.html>.