

Xpert[®] MTB/XDR

REF GXMTB/XDR-10

Návod k použití

IVD CE

Prohlášení o ochranných známkách, patentech a autorských právech

Cepheid®, logo Cepheid, GeneXpert® a Xpert® jsou ochranné známky společnosti Cepheid registrované v USA a dalších zemích. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

ZAKOUPENÍM TOHOTO VÝROBKU PŘECHÁZÍ NA KUPUJÍCÍHO NEPŘENOSNÉ PRÁVO POUŽÍVAT JEJ V SOULADU S TÍMTO NÁVODEM K POUŽITÍ. ŽÁDNÁ DALŠÍ PRÁVA NEJSOU PŘEVÁDĚNA VÝSLOVNĚ, IMPLICITNĚ ANI ZPROSTŘEDKOVANĚ. ZAKOUPENÍM TOHOTO VÝROBKU DÁLE NEVZNIKAJÍ ŽÁDNÁ PRÁVA NA DALŠÍ PRODEJ.

© 2020-2021 Cepheid.

Popis změn naleznete v části 25 Historie revizí.

Xpert[®] MTB/XDR

Pro diagnostické použití *in vitro*

1 Vlastní název

Xpert[®] MTB/XDR

2 Obecný nebo obvyklý název

Xpert MTB/XDR

3 Zamýšlený účel

3.1 Zamýšlené použití

Test Xpert MTB/XDR, prováděný na přístrojových systémech GeneXpert, je kvalitativní *in vitro* diagnostický test s vnořenou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) v reálném čase pro detekci DNA komplexu *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) s rozsáhlou rezistencí k lékům (XDR) v nezpracovaných vzorcích sputa, koncentrovaných sedimentech připravených ze sputa nebo v kultuře BD[™] Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT[™]). Ve vzorcích, kde je detekována MTB, může test Xpert MTB/XDR detekovat také mutace spojené s rezistencí na isoniazid (INH) v genech *katG* a *fabG1*, v intergenové oblasti *oxyR-ahpC* a promotoru *inhA*; rezistence na ethionamid (ETH) je spojena pouze s mutacemi promotoru *inhA*; rezistence k fluorochinolonům (FLQ) spojená s mutacemi v oblastech určujících rezistenci k chinolonům (QRDR) *gyrA* a *gyrB*; a mutace v genu *rrs* a promotorové oblasti *eis* spojené s druhou linií injekčních léčiv (SLID).

Test Xpert MTB/XDR je určen k použití jako reflexní test pro vzorek (nezpracované sputum, koncentrovaný sediment sputa nebo kultivace MGIT), který je označen jako MTB pozitivní. Tento test je určen jako pomůcka při diagnostice tuberkulózy XDR (TB), pokud je použit ve spojení s klinickými a dalšími laboratorními nálezy.

3.2 Zamýšlený uživatel/prostředí

Test Xpert MTB/XDR je určen k provádění vyškolenými uživateli v laboratorních podmínkách.

4 Shrnutí a vysvětlení

Tuberkulóza (TBC), onemocnění způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, je stále jednou z nejsmrtelnějších nemocí na světě. V roce 2018 bylo podle odhadů zaznamenáno 10 milionů nových případů tuberkulózy a přibližně půl milionu nových případů tuberkulózy rezistentní na rifampicin, z nichž 78 % tvořila multirezistentní tuberkulóza (MDR-TB)¹. MDR-TB, definovaná jako rezistence vůči isoniazidu a rifampicinu (dvěma nejúčinnějším lékům první linie), nadále představuje hrozbu pro veřejné zdraví a nové pokyny pro léčbu vyzývající k Světová zdravotnická organizace (WHO)^{2,3}. Nicméně v roce 2018 činil celosvětový počet oznámených případů MDR/RR-TB stále jen 39 % odhadovaných incidentních případů a počet osob zařazených do léčby odpovídal 32 %¹. Stejně tak roste i obava z nediagnostikované a neléčené TBC rezistentní na isoniazid a citlivé na rifampicin. Bez snadného přístupu k testování rezistence na INH mají země problémy s identifikací pacientů a s implementací doporučení WHO pro léčbu H_r-TB z roku 2018⁴. Nejznejpokojivější případy TBC jsou způsobeny MDR kmeny MTB, které získaly další rezistenci na fluorochinolony a některý z léků druhé linie podávaných injekčně, amikacin (AMK), kanamycin (KAN) nebo kapreomycin (CAP). Tyto vysoce rezistentní kmeny se označují jako extenzivně lékově rezistentní TBC (XDR-TB). Léčba XDR-TB je velmi obtížná a může vést k vysoké úmrtnosti, zejména pokud je diagnóza XDR-TB přehlédnuta a vhodná léčba je opožděna⁵.

Kultivační a fenotypové testování citlivosti MTB na léčiva je časově a pracovně náročné a představuje vážné biologické riziko pro laboratorní pracovníky, což vede k tomu, že v zemích s endemickým výskytem MTB je méně akreditovaných zařízení². I když je kultivační testování citlivosti k lékům k dispozici, může trvat týdny až měsíce. MTB lze také testovat na rezistenci k lékům pomocí rychlých, citlivých a bezpečnějších genotypových testů, které zjišťují rezistenci identifikací mutací, o nichž je známo, že u většiny klinických kmenů způsobují rezistenci k lékům první a druhé volby². Přístupy genotypového testování, které lze omezit na několik manuálních kroků, jsou vhodnější pro blízkou péči o pacienty, což může výrazně rozšířit jejich dostupnost pro zdravotně nedostatečně ošetřenou populaci v nízké a vysoce endemických prostředích⁵.

5 Zásada postupu

Test Xpert MTB/XDR je automatizovaný diagnostický test *in vitro* pro detekci DNA komplexu XDR MTB a mutací souvisejících s rezistencí. Test se provádí na přístrojových systémech Cepheid GeneXpert vybavených barevnými moduly GeneXpert 10.

Přístrojové systémy GeneXpert integrují a automatizují zpracování vzorků, amplifikaci nukleových kyselin a detekci cílových sekvencí ve vzorcích pomocí vnořené PCR v reálném čase a detekce tajícího píku. Přístrojové systémy GeneXpert se skládají z přístroje, osobního počítače, snímače čárových kódů a předinstalovaného softwaru pro provádění testů na odebraných vzorcích a zobrazování výsledků. Systém vyžaduje použití jednorázových jednorázových kazet Xpert, které obsahují specifická cílová činidla polymerázové řetězové reakce (PCR) a hostí proces PCR a detekci tání píků. Vzhledem k tomu, že kazety Xpert jsou samostatné, je minimalizováno riziko křížové kontaminace mezi vzorky. Úplný popis systému naleznete v *příručce pro obsluhu systému GeneXpert Dx*.

Testovací kazeta Xpert MTB/XDR obsahuje činidla pro detekci profilu XDR MTB a kontrolu zpracování vzorku (SPC) pro kontrolu adekvátního zpracování cílových bakterií a monitorování přítomnosti inhibitoru (inhibitorů) v reakci PCR. Kontrola kontroly sondy (PCC) ověřuje rehydrataci činidla, naplnění zkumavky PCR v kazetě, integritu sondy a stabilitu barviva.

Testovací kazeta Xpert MTB/XDR má všechna činidla na palubě, s výjimkou činidla na vzorek (SR), které musí uživatel přidat do vzorku před vložením upraveného vzorku do kazety. Test je určen k provedení jako reflexní test pro MTB pozitivní vzorky.

Výsledky jsou interpretovány softwarem GeneXpert z naměřených fluorescenčních signálů a zabudovaných výpočetních algoritmů a jsou zobrazeny v okně View Results (Zobrazit výsledky) v tabulkovém a grafickém formátu. Hlásí také, zda je test neplatný, zda se vyskytla chyba nebo zda nepřinesl žádný výsledek. Xpert MTB/XDR detekuje XDR MTB s rezistencí k INH, ETH, FLQ a SLID přímo z nezpracovaného sputa nebo z koncentrovaného sedimentu ze sputa za méně než 90 minut.

6 Poskytnutý materiál

Souprava Xpert MTB/XDR obsahuje dostatečné množství reagentů pro zpracování 10 vzorků pacientů nebo vzorků pro kontrolu kvality. Souprava obsahuje následující položky:

Kazety Xpert MTB/XDR s integrovanými reakčními

- Korálek 1, korálek 2, korálek 3, korálek 4 a korálek 5 (lyofilizované)
- Kontrolní kuličky pro zpracování vzorku (lyofilizované)
- Reagencie 1
- Reagencie 2

Jednorázové přenosové sadu

Vzorkovací

- Soubory s definicemi analýz (ADF)
- Pokyny pro import ADF do softwaru GeneXpert
- Návod k použití (příbalová informace)

zkumavkami 10 na sadu

- 1 kus z každé kazety 1 kus z každé kazety
- 4,0 ml na kazetu
- 4,0 ml na kazetu

pipety 1 sáček po 12 kusech na

činidlo 10 x 8 ml v lahvičce

CD1 na sadu

Poz	Bezpečnostní listy (SDS) jsou k dispozici na adrese www.cepheid.com nebo www.cepheidinternational.com pod odkazem SUPPORT . tab.
Poz	Hovězí sérový albumin (BSA) v kuličkách tohoto výrobku byl vyroben výhradně z hovězí plazmy pocházející ze spojených států. Zvířatům nebyly podávány žádné bílkoviny přezvýkavců ani jiné živočišné bílkoviny; zvířata prošla testy ante a post mortem. Během zpracování nedošlo ke smíchání materiálu s jinými živočišnými materiály.
Poz	Přenosové pipety mají jednu značku, která představuje minimální objem upraveného vzorku potřebný k přenosu do kazety. Používejte je pouze k tomuto účelu. Všechny ostatní pipety musí dodat laboratoř.

7 Skladování a manipulace

- Obsah soupravy Xpert MTB/XDR uchovávejte při teplotě 2-28 °C až do uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku.
- Víko kazety neotvírejte, dokud nejste připraveni provést testování.
- Zahajte test do 2,5 hodiny po přidání SR ke vzorku nebo do 4 hodin, pokud je skladován při teplotě 2-8 °C.
- Nepoužívejte reagentie nebo kazety s prošlou dobou použitelnosti.
- Nepoužívejte kazetu, která vytekla.

8 Požadované, ale neposkytované materiály

- Systém GeneXpert Dx: , počítačem, snímačem čárových kódů a návodem k obsluze: GeneXpert přístroj vybavený barevnými moduly GeneXpert 10.
 - Pro systém GeneXpert Dx: verze softwaru 6.2 nebo vyšší
 - Tiskárna: V případě potřeby tiskárny se obraťte na obchodního zástupce společnosti Cepheid, který zajistí nákup doporučené tiskárny.
- Sterilní šroubovací nádoba na vzorky
- Jednorázové rukavice
- Etikety a/nebo nesmazatelná popisovací značka
- Sterilní pipety pro zpracování vzorků

9 Upozornění a bezpečnostní opatření

9.1 Obecné

- Pro diagnostické použití *in vitro*
- Se všemi biologickými vzorky, včetně použitých kazet, zacházejte, jako by mohly přenášet infekční agens. Protože často není možné zjistit, které z nich mohou být infekční, mělo by se se všemi biologickými vzorky zacházet s použitím standardních bezpečnostních opatření.
- Pokyny pro manipulaci se vzorky jsou k dispozici v amerických Centrech pro kontrolu a prevenci nemocí³ a v Institutu klinických a laboratorních standardů^{6,7,8}.
- Dodržujte bezpečnostní postupy vaší instituce pro práci s chemikáliemi a manipulaci s biologickými vzorky.
- Při manipulaci se vzorky a činidly používejte ochranné rukavice na jedno použití, laboratorní pláště a ochranu očí. Po manipulaci se vzorky a testovacími činidly si důkladně umyjte ruce.
- Biologické vzorky, přenosová zařízení a použité kazety by měly být považovány za schopné přenášet infekční agens vyžadující standardní bezpečnostní opatření. Při správné likvidaci použitých kazet a nepoužitých činidel postupujte podle postupů pro ekologický odpad vaší instituce. Tyto materiály mohou vykazovat vlastnosti nebezpečného chemického odpadu vyžadujícího zvláštní národní nebo regionální postupy likvidace. Pokud národní nebo regionální předpisy neposkytují jasné pokyny pro správnou likvidaci, měly by být biologické vzorky a použité kazety likvidovány podle pokynů WHO [Světové zdravotnické organizace] ^{pro} nakládání se zdravotnickým odpadem a jeho likvidaci⁹.

- Reagencie pro vzorky obsahuje hydroxid sodný (pH > 12,5) a isopropanol. Zdraví škodlivý při požití (H302), způsobuje těžké popáleniny kůže a poškození očí (H314). Hořlavá kapalina a páry (H226).
- Výkonnostní charakteristiky této zkoušky byly stanoveny s typy vzorků uvedenými v oddíle 3.1. Pouze oddíl Zamýšlené použití. Výkonnost této zkoušky s jinými typy vzorků nebo vzorků nebyla hodnocena.
- Dodržujte bezpečnostní postupy vaší instituce pro práci s chemikáliemi a manipulaci s biologickými vzorky.

9.2 Vzorek

- Postupy odběru vzorků a manipulace s nimi vyžadují zvláštní školení a pokyny.
- Během přepravy vzorku dodržujte správné skladovací podmínky, aby byla zajištěna neporušenost vzorku (viz oddíl 12. Postup). Stabilita vzorku za jiných než doporučených přepravních podmínek nebyla hodnocena.
- Odmítněte vzorky se zjevnými částicemi potravin nebo jinými pevnými částicemi.
- Správný odběr, skladování a přeprava vzorků jsou nezbytné pro správné výsledky.
- Kultivační materiál z pozitivní kultivační lahvičky MGIT lze použít buď neředěný, nebo 100krát zředěný s PBS nebo médiem Middlebrook 7H9. Test lze také provést s tepelně inaktivovanými kulturami. Pro tepelnou inaktivaci se doporučuje kulturu nejprve 100krát zředit médiem PBS nebo Middlebrook 7H9 a poté zahřívát při 100 °C po dobu 20 minut.

9.3 Test/činidlo

- Nenahrazujte testovací činidla Xpert MTB/XDR jinými činidly.
- Neotvírejte víčko testovací kazety Xpert MTB/XDR, s výjimkou přidání vzorku.
- Nepoužívejte kazetu, která byla po vyjmutí ze sady upuštěna nebo s ní bylo zatřesen po otevření víka kazety. Protřepání nebo upuštění kazety po otevření víčka může vést k falešným nebo neurčitým výsledkům.
- Neumísťujte identifikační štítek vzorku na víko kazety ani na štítek s čárovým kódem.
- Nepoužívejte kazetu s poškozenou reakční trubicí.
- Každá jednorázová kazeta s testem Xpert MTB/XDR slouží ke zpracování jednoho testu. Spotřebované kazety nepoužívejte opakovaně.
- K přenosu jednoho vzorku se používá jednorázová pipeta na jedno použití. Použité jednorázové pipety nepoužívejte opakovaně.
- Nepoužívejte zásobník, pokud se zdá být mokrá nebo pokud je těsnění víka porušené.
- Aby se zabránilo kontaminaci vzorků nebo reagentů, doporučuje se dodržovat správné laboratorní postupy, včetně výměny rukavic mezi manipulací se vzorky pacientů.
- V případě rozlití vzorků nebo kontrolních látek si nasadte rukavice a rozlitou látku pohl'te papírovými ručníky. Poté kontaminované místo důkladně vyčistěte čerstvě připraveným chlorovým bělidlém pro domácnost v poměru 1:10. Konečná koncentrace aktivního chloru by měla být 0,5 % bez ohledu na koncentraci bělidla pro domácnost ve vaší zemi. Vyčkejte minimálně dvě minuty kontaktu. Před použitím 70% denaturovaného ethanolu k odstranění zbytků bělidla se ujistěte, že je pracovní plocha suchá. Před dalším postupem nechte povrch zcela vyschnout. Nebo postupujte podle standardních postupů vaší instituce pro případ kontaminace nebo rozlití. V případě zařízení postupujte podle doporučení výrobce pro dekontaminaci zařízení.
- Test Xpert MTB/XDR byl validován pomocí softwaru Cepheid GeneXpert Dx verze 6.2 nebo vyšší.

10 Chemická nebezpečí^{9,10}

Reagencie pro vzorky:

- Obsahuje isopropylalkohol
- Obsahuje hydroxid sodný
- Signální slovo: NEBEZPEČÍ
-

Výstražné symboly nebezpečnosti podle GHS



OSN:

- **Standardní věty OSN o nebezpečnosti**
 - Hořlavá kapalina a páry.
 - Způsobuje těžké popáleniny kůže a poškození očí.
 - Způsobuje vážné poškození očí.
 - Podezření, že způsobuje genetické vady.
 - Podezření na poškození plodnosti nebo nenarozeného dítěte.

- Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici.

- **Bezpečnostní pokyny GHS OSN**
- **Prevence**
 - Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.
 - Nemanipulujte s ním, dokud si nepřečtete a neporozumíte všem bezpečnostním pokynům.
 - Uchovávejte mimo dosah tepla, jisker, otevřeného ohně a/nebo horkých povrchů. - Zákaz kouření.
 - Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou.
 - Nevdechujte mlhu, výpary a/nebo spreje.
 - Po manipulaci s ním jej důkladně omyjte.
 - Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv, ochranu očí a obličeje.
 - Podle potřeby používejte osobní ochranné prostředky.
- **Reakce**
 - V případě požáru: V případě požáru použijte vhodné hasicí prostředky.
 - PŘI INHALACI: Přeneste oběť na čerstvý vzduch a udržujte ji v klidu v poloze, která je pro dýchání pohodlná.
 - Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře.
 - POKUD JE NA KÚŽI (nebo na vlasech): Okamžitě si svlékněte veškerý kontaminovaný oděv. Opláchněte pokožku vodou/sprchou.
 - Kontaminovaný oděv před dalším použitím vyperte.
 - Specifické ošetření viz doplňkové informace o první pomoci.
 - PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně několik minut vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li přítomny a lze-li to snadno provést. Pokračujte ve vyplachování.
 - POKUD JE PŘELOŽEN: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení.
 - Jste-li vystaveni nebo znepokojeni: Vyhledejte lékařskou pomoc/opatření.
 - Pokud se necítíte dobře, vyhledejte lékařskou pomoc.
- **Skladování/likvidace**
 - Obsah a/nebo obal zlikvidujte v souladu s místními, regionálními, národními a/nebo mezinárodními předpisy.

11 Odběr, přeprava a skladování vzorků

Vzorky lze odebírat podle standardních postupů uživatelské instituce.

Správný odběr, skladování a přeprava vzorků jsou pro provedení tohoto testu zásadní. Stabilita vzorků za jiných podmínek přepravy a skladování, než jsou uvedeny níže, nebyla u testu Xpert MTB/XDR hodnocena.

11.1 Transport sedimentu sputa

Vzorky sedimentů přepravujte při teplotě 2-8 °C.

11.2 Transport nezpracovaného sputa

Nezpracované vzorky sputa přepravujte při teplotě 2-35 °C.

11.3 Skladování vzorků

Nezpracované vzorky sputa lze skladovat při teplotě 2-35 °C po dobu 7 dnů (včetně doby přepravy).

Dekontaminovaný/koncentrovaný a resuspendovaný sediment sputa lze skladovat při teplotě 2-8 °C po dobu až 7 dnů, dokud se neprovede testování na přístroji GeneXpert.

Při testování nezpracovaného sputa nebo dekontaminovaného/koncentrovaného sputálního sedimentu se pro určení odpovídajícího objemu vzorku řiďte níže uvedenou tabulkou 1.

Tabulka 1. Požadovaný objem vzorku

Typ vzorku	Minimální objem pro jeden test	Maximální objem vzorku	Poměr vzorku a vzorkovacího činidla (SR)
Sediment sputa	0,5 ml	2,5 ml	1:3 ^a
Nezpracované sputum	1,0 ml	4,0 ml	1:2

při objemu vzorku 0,7 ml nebo větším pro jeden test by měl být použit poměr vzorku k SR 1:2.

11.4 Zbytky vzorků ošetřené SR

Test Xpert MTB/XDR lze použít k testování zbytků SR ošetřených vzorků z testů Xpert MTB/RIF nebo Xpert MTB/RIF Ultra. V takových případech však musí být objem zbytku vzorku ošetřeného SR ≥ 2 ml a směs by měla být skladována při teplotě 2-8 °C nejdéle 4 hodiny nebo při teplotě do 35 °C nejdéle 2,5 hodiny.

11.5 Kultivace izolátů ze zkumavky BD s mykobakteriálním růstovým indikátorem (MGIT)

Během klinické studie byly získány platné výsledky s testem Xpert MTB/XDR s použitím MTB pozitivních kultur ze zkumavky BD Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT). Pro testování MTB izolátů z MGIT pozitivních kultivačních lahvíček použijte nejméně 1,0 ml kultivačního materiálu.

Poznámka S kulturami mykobakterií z klinických vzorků by se mělo zacházet za vhodných kontrolních opatření biologické bezpečnosti.

Před zahájením testu by měl být použit poměr vzorku a SR 1:2, po kterém následuje 15minutová inkubace s 10sekundovým vířením každých 5 minut, aby se zabránilo usazování nebo nepřetržitému třepání. Spusťte test GeneXpert do 30 minut po přidání 2 ml SR ke kultivačnímu materiálu.

12 Postup

12.1 Postup pro nezpracované sputum

Důležité Zahajte test do 2,5 hodiny po přidání SR ke vzorku nebo do 4 hodin, pokud je skladován při teplotě 2-8 °C.

Poznámka Vzorky se zjevnými částicemi potravin nebo jinými pevnými částicemi odmítněte.

Požadavky na objem: Je zapotřebí ≥ 1 ml nezpracovaného sputa.

1. Opatrně otevřete víko nepropustné nádoby na sběr sputa. Viz obrázek 1.

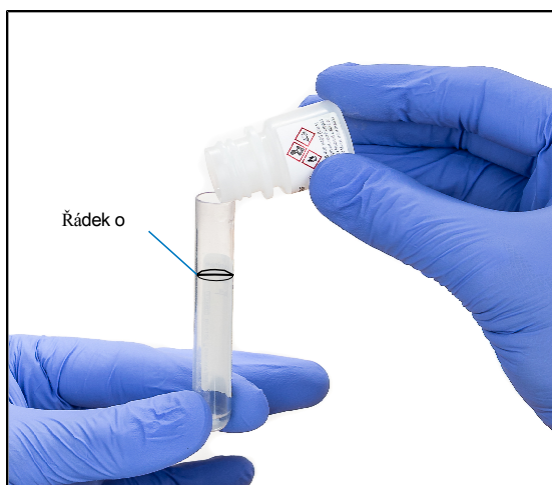


Obrázek 1. Otevření nádoby na sběr sputa

2. Do sputa nalijte přibližně dvojnásobek objemu SR (ředění 2:1, SR:sputum). Viz obrázek 2 a obrázek 3.



Obrázek 2. Příklad ředění 2:1 (8 ml SR:4 ml sputa)



Obrázek 3. Příklad ředění 2:1 (2 ml SR:1 ml sputa)

Poznámka Zbytky SR a lahvičky zlikvidujte do vhodné nádoby na odpad podle standardních postupů vaší instituce.

3. Zajistěte víko nádoby na vzorky.
4. Silně protřeptejте 10 až 20krát nebo alespoň 10 sekund vířivě protřepávejte.

Poznámka: Jeden pohyb tam a zpět představuje jedno zatřesení.

5. Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě a poté vzorek 10 až 20krát silně protřeptejте nebo alespoň 10 sekund vortexujte.
6. Vzorek inkubujte při pokojové teplotě dalších 5 minut.

12.2 Postup pro dekontaminaci koncentrovaného sedimentu sputa

Důležité Zahajte test do 2,5 hodiny po přidání SR ke vzorku nebo do 4 hodin, pokud je skladován při teplotě 2-8 °C.

Poznámka Vzorky se zjevnými částicemi potravin nebo jinými pevnými částicemi odmítněte.

Požadavky na objem: metoda Kenta a Kubicy¹¹ (postup digesce a dekontaminace pomocí NALC-NaOH metodou a resuspendované v 67 mM fosfátovém/H₂O pufru) lze testovat pomocí testu Xpert MTB/XDR. Po resuspenzi si ponechte alespoň 0,5 ml resuspendovaného sedimentu pro test Xpert MTB/XDR. U všech objemů menších než 0,7 ml proveďte kroky 1 až 5 pro přípravu vzorků. Tyto kroky vyžadují 3 díly SR na 1 díl sedimentu, aby se vytvořil dostatečný objem pro optimální provedení testu. Pokud je objem vzorku roven nebo větší než 0,7 ml, lze odpovídající objem testu získat přidáním 2 dílů SR na 1 díl sedimentu. V tomto příkladu se přidá 1,4 ml SR k 0,7 ml sedimentu. Tyto objemy se škálují v poměru 2 díly SR na 1 díl sedimentu.

1. Přeneste 0,5 ml celkové resuspendované pelety do kónické zkumavky se šroubovacím uzávěrem označené identifikačním číslem vzorku a/nebo pacienta pomocí přenosové pipety.

Poznámka Pokud nebudou resuspendované sedimenty ihned zpracovány, skladujte je při teplotě 2-8 °C. Neskladujte déle než 7 dní.

2. Přidejte 1,5 ml vzorkovacího činidla (SR) k 0,5 ml resuspendovaného sedimentu.
3. Silně protřeptejte 10 až 20krát nebo alespoň 10 sekund vířivě protřepávejte.

Poznámka: Jeden pohyb tam a zpět představuje jedno zatřesení.

4. Inkubujte 10 minut při pokojové teplotě a poté vzorek 10 až 20krát silně protřeptejte nebo alespoň 10 sekund vortexujte.
5. Vzorek inkubujte při pokojové teplotě dalších 5 minut.

12.3 Příprava kazety

Důležité

Zkontrolujte, zda je modul připraven k přijetí kazety. Spusťte test co nejdříve, nejpozději do 2,5 hodiny po přidání vzorku ošetřeného vzorkovacím činidlem do kazety nebo do 4 hodin, pokud je skladován při teplotě 2-8 °C.

Získejte následující položky: Vezměte si kazetu Xpert, přenosovou pipetu (je k dispozici) a vhodně odebraný a označený testovaný vzorek.

1. Vyjměte kazetu z obalu.
2. Zkontrolujte, zda není kazeta poškozená. Pokud je poškozená, nepoužívejte ji.
3. Uveďte kazetu na pokojovou teplotu. Každou kazetu Xpert MTB/XDR označte ID vzorku. Viz obrázek 4.



Obrázek 4. Zápis na stranu kazety.

Poz

Napište na stranu kazety nebo nalepte identifikační štítek. Štítek nelepte na víko kazety ani přes stávající 2D čárový kód na kazetě.

4. Otevřete víko kazety a poté otevřete nádobku na vzorek.
5. Pomocí přiložené přenosové pipety nasajte zkupalný vzorek do linie na pipetě. Pokud je objem vzorku nedostatečný, dále jej nezpracovávejte. Viz obrázek 5.



Obrázek 5. Aspirace po čáru na pipetě

6. Vzorek dávkuje pomalu, abyste minimalizovali riziko tvorby aerosolu. Viz obrázek 6.



Obrázek 6. Kazeta Xpert MTB/XDR

7. Zavřete víko kazety.

12.4 Spuštění testu

Důležité

Před zahájením testu se ujistěte, že je do softwaru importován soubor s definicí testu Xpert MTB/XDR. V této části jsou uvedeny základní kroky spuštění testu. Podrobné pokyny naleznete v *příručce pro obsluhu systému GeneXpert Dx*.

Poznámka Kroky, které budete provádět, se mohou lišit, pokud správce systému změnil výchozí pracovní postup systému.

1. Zapněte přístroj GeneXpert:
- Pokud používáte přístroj GeneXpert Dx, nejprve zapněte přístroj a poté počítač. Software GeneXpert Dx se spustí automaticky nebo může být nutné dvakrát kliknout na ikonu zástupce GeneXpert Dx na ploše systému Windows®.
2. Přihlaste se do softwaru GeneXpert Instrument System pomocí svého uživatelského jména a hesla.
3. V okně GeneXpert Dx System klikněte na tlačítko **Vytvořit test**. Zobrazí se okno **Vytvořit test**.
4. Naskenujte ID pacienta nebo vzorku nebo zadejte ID pacienta nebo vzorku. Pokud zadáváte ID vzorku, ujistěte se, že je ID vzorku zadáno správně. ID vzorku se zobrazuje na levé straně okna **View Results (Zobrazit výsledky)** a je spojeno s výsledky testu.
5. Naskenujte čárový kód na kazetě Xpert MTB/XDR. Na základě informací z čárového kódu software automaticky vyplní pole pro následující pole: **ID šarže reagentie, S/N kazety a datum expirace**. Viz obrázek 7.

Poznámka Pokud se čárový kód na kazetě Xpert MTB/XDR neskenuje, opakujte test s novou kazetou.

Obrázek 7. Okno pro vytvoření testu GX Dx

6. Klikněte na tlačítko **Spustit test**. Do zobrazeného dialogového okna zadejte heslo.
7. Pro přístroj GeneXpert Dx:
 - a) Otevřete dvířka modulu přístroje s blikajícím zeleným světlem a vložte kazetu.
 - b) Zavřete dveře. Test se spustí a zelená kontrolka přestane blikat. Po dokončení testu kontrolka zhasne.
 - c) Před otevřením dvířek modulu a vyjmutím kazety počkejte, dokud systém neuvolní zámek dvířek.
8. Použité kazety zlikvidujte do příslušného kontejneru na odpadní vzorky v souladu se standardními postupy vaší instituce.

13 Zobrazení a tisk výsledků

V této části jsou uvedeny základní kroky pro zobrazení a tisk výsledků. Podrobnější pokyny k prohlížení a tisku výsledků naleznete v *příručce pro obsluhu systému GeneXpert Dx* nebo v *příručce pro obsluhu systému GeneXpert Infinity*, v závislosti na použitém modelu.

1. Kliknutím na ikonu **Zobrazit výsledky** zobrazíte výsledky.
2. Po dokončení testu klikněte na tlačítko **Report** v okně **View Results (Zobrazit výsledky)** a zobrazte a/nebo vygenerujte soubor zprávy PDF.

14 Vestavěné kontroly kvality

Každý test zahrnuje kontrolu zpracování vzorku (SPC) a kontrolu sondy (PCC).

- **Kontrola zpracování vzorků (SPC)** - SPC ověřuje, zda je zpracování vzorků odpovídající. Kromě toho tato kontrola zjišťuje inhibici testu PCR v reálném čase způsobenou vzorkem, zajišťuje, že podmínky PCR reakce (teplota a čas) jsou vhodné pro amplifikační reakci a že činidla PCR jsou funkční. SPC by měl být pozitivní v negativním vzorku a může být negativní nebo pozitivní v pozitivním vzorku. SPC vyhovuje, pokud splňuje přiřazená kritéria přijatelnosti.
- **Kontrola sond (PCC)** - před zahájením reakce PCR měří systém GeneXpert fluorescenční signál ze sond a sleduje rehydrataci kuliček, naplnění reakční zkumavky, integritu sond a stabilitu barviva. PCC projde, pokud splňuje přiřazená kritéria přijatelnosti.
- **Kontrola přiměřenosti objemu vzorku (SVA)** - před zpracováním vzorku systém GeneXpert změří, zda je v komůrce vzorku dostatečný objem vzorku. Pokud kontrola SVA selže, znamená to, že do vzorkovací komory nebyl přidán dostatečný objem vzorku potřebný k testování.

Externí kontroly - externí kontroly mohou být použity v souladu s místními, státními a federálními akreditačními organizacemi.

15 Interpretace výsledků

Přístrojové systémy GeneXpert generují výsledky z kombinace naměřených fluorescenčních signálů a hodnot teploty tání (T_m). Systém GeneXpert detekuje mutace a sekvence divokého typu pomocí hodnot T_m .

Stanovení citlivosti nebo rezistence závisí na tom, kde se hodnoty T_m nacházejí v rámci divokého typu, resp. mutantního okna pro konkrétní analyt. Pozitivní výsledky testu Xpert MTB/XDR mohou být: **MTB DETEKTOVÁN** a všechny cíle rezistence **NEDETEKTOVÁNY** nebo **MTB DETEKTOVÁN** a jeden nebo více cílů rezistence je **DETEKTOVÁN** nebo **MTB DETEKTOVÁN** a/nebo jeden nebo více následujících cílů rezistence je **INDETERMINOVÁN**. Seznam možných výsledků pro jednotlivé cíle viz tabulka 2.

Tabulka 2. Možné výsledky testů pro každý cíl v testu Xpert MTB/XDR

Třída léků	Výsledek volání
NEUPLATŇUJE SE	NEPLATNÝ/CHYBNÝ/ŽÁDNÝ VÝSLEDEK
	MTB DETECTED
	MTB NEBYL ZJIŠTĚN
Isoniazid	Nízká odolnost INH DETECTED
	DETEKOVANÁ rezistence INH
	Rezistence na INH NEDETEKTOVÁNA
	Rezistence INH INDETERMINATE
Fluorochinolony	Nízká odolnost FLQ DETECTED
	Odolnost FLQ DETEKTOVÁNA
	Odolnost FLQ NEDETEKTOVÁNA
	Odolnost FLQ INDETERMINATE
Amikacin	Odolnost AMK DETEKTOVÁNA
	Odolnost AMK NEDETEKTOVÁNA
	Odolnost AMK INDETERMINATE
Kanamycin	Odolnost KAN DETEKTOVÁNA
	KAN Odpor NEDETEKTOVÁN
	Odpor KAN INDETERMINATE
Kapreomycin	DETEKOVANÝ odpor CAP
	Odolnost CAP NEDETEKTOVÁNA
	Odpor CAP INDETERMINATE

Třída léků	Výsledek volání
Ethionamid ^a	Odolnost ETH DETEKTOVÁNA
	Odpor ETH NEDETEKTOVÁN

^a Ethionamid neposkytuje neurčitou látku podle návrhu testu.

V tabulce 3 jsou shrnuty geny, na které se test Xpert MTB/XDR zaměřuje, a kodonová oblast a nukleotidy, které jsou u každého z genů zkoumaných za účelem identifikace nebo odvození rezistence k léčivům zahrnuté.

Tabulka 3. Oblasti určující rezistenci k léčivům, které byly dotazovány

Drog y	Cílová skupina genů	Oblasti kodonů	Nukleotidy
Isoniazid	promotor <i>inhA</i>	NA	-1 až -32 intergenní
	<i>katG</i>	311-319	939-957
	<i>fabG1</i>	199-210	597-630
	<i>oxyR- ahpC</i> intergenová oblast	NA	-5 až -50 intergenní (nebo -47 až -92) ^{12,13}
Ethionamid	promotor <i>inhA</i>	NA	-1 až -32 intergenní
Fluorochinolony	<i>gyrA</i>	87-95	261-285
	<i>gyrB</i>	531-544 (nebo 492-505) ^{12,14}	1596-1632
Amikacin, kanamycin, kapreomycin	<i>rrs</i>	NA	1396-1417
	promotor <i>eis</i>	NA	-6 až -42 intergenní

Příklady možných výsledků a odpovídající interpretace jsou uvedeny v tabulce 4. Na obrázcích 8 až 16 jsou uvedeny příklady možných výsledků testu Xpert MTB/XDR.

Tabulka 4. Příklady výsledků Xpert MTB/XDR a jejich interpretace

Výsledek	Výklad
MTB DETEKTOVÁNO; INH rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA FLQ rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA AMK rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA KAN rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA CAP rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA ETH rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci na INH, FLQ, AMK, KAN, CAP nebo ETH nebyly zjištěny. • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; INH Odpor DETEKTOVÁN FLQ Odpor DETEKTOVÁN AMK Odpor DETEKTOVÁN KAN Odpor DETEKTOVÁN CAP Odpor DETEKTOVÁN ETH Odpor DETEKTOVÁN	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace přispívající k rezistenci k INH byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, intergenová oblast <i>oxyR-ahpC</i> a promotor <i>inhA</i>. • Mutace přispívající k rezistenci k FLQ byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>gyrA</i> a <i>gyrB</i> oblasti určující rezistenci k chinolonům (QRDR). • Mutace přispívající k rezistenci k AMK byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: gen <i>rrs</i> a promotor <i>eis</i>. • Mutace přispívající k rezistenci vůči KAN byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: gen <i>rrs</i> a promotor <i>eis</i>. • Mutace přispívající k rezistenci na CAP byly zjištěny v těchto genech: gen <i>rrs</i> • Mutace přispívající k rezistenci k ETH byly zjištěny v následujícím genu: promotor <i>inhA</i> • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; DETEKOVANÁ rezistence INH FLQ rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA AMK rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA KAN rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA CAP rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA ETH rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci k FLQ, AMK, KAN, CAP a ETH nebyly zjištěny. • Mutace přispívající k rezistenci k INH byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>katG</i>, <i>fabG1</i> a intergenová oblast <i>oxyR-ahpC</i>. • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; DETEKOVANÁ rezistence INH FLQ rezistence NEDOTČENÁ AMK rezistence NEDOTČENÁ KAN rezistence NEDOTČENÁ CAP rezistence NEDOTČENÁ ETH rezistence NEDOTČENÁ	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci na AMK, KAN, CAP a ETH nebyly zjištěny. • Mutace přispívající k rezistenci k INH byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>katG</i>, <i>fabG1</i> a intergenová oblast <i>oxyR-ahpC</i>. • Mutace, které přispívají k rezistenci k FLQ, nemohly být stanoveny z důvodu detekce pouze WT Tm z jedné nebo více sond a chybějících Tm z jedné nebo více sond zaměřených na jeden nebo více z následujících genů: <i>gyrA</i> nebo <i>gyrB</i>. "NEBO" žádný Tm z některé ze sond zaměřených na geny <i>gyrA</i> a <i>gyrB</i>. • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.

Výsledek	Výklad
MTB DETEKTOVÁNO; Nízká rezistence INH DETEKTOVÁNO Rezistence FLQ NEDETEKTOVÁNO Rezistence AMK NEDETEKTOVÁNO Rezistence KAN NEDETEKTOVÁNO Rezistence CAP NEDETEKTOVÁNO Rezistence ETH DETEKTOVÁNO	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci na FLQ, AMK, KAN a CAP nebyly zjištěny. • Mutace, které přispívají k nízké rezistenci k INH, byly zjištěny u promotorové oblasti <i>inhA</i> • Mutace přispívající k rezistenci k ETH byly zjištěny u promotorové oblasti <i>inhA</i> • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; INH rezistence NEDETEKTOVÁNA nízká FLQ rezistence DETEKTOVÁNA AMK rezistence NEDETEKTOVÁNA KAN rezistence NEDETEKTOVÁNA CAP rezistence NEDETEKTOVÁNA ETH rezistence NEDETEKTOVÁNA	Ve vzorku je přítomen cíl MTB; je zjištěna nízká hladina FLQ, rezistence: • Mutace vedoucí k rezistenci na INH, AMK, KAN, CAP a ETH nebyly zjištěny. • Mutace přispívající k nízké rezistenci vůči FLQ byly zjištěny v následujících genech: <i>gyrA</i> • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; DETEKOVANÁ rezistence INH FLQ rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA AMK rezistence ZJIŠTĚNA KAN rezistence ZJIŠTĚNA CAP rezistence ZJIŠTĚNA ETH rezistence NENÍ ZJIŠTĚNA	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci na FLQ a ETH nebyly zjištěny. • Mutace přispívající k rezistenci k INH byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, <i>oxyR-aphC</i>. • Mutace přispívající k rezistenci k AMK byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: gen <i>rrs</i>; promotor <i>eis</i> • Mutace přispívající k rezistenci vůči KAN byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: gen <i>rrs</i>; promotor <i>eis</i> • Mutace přispívající k rezistenci na CAP byly zjištěny v těchto genech: gen <i>rrs</i> • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB DETEKTOVÁNO; DETEKOVANÁ rezistence INH Nízký odpor FLQ DETEKTOVÁNO Odpor AMK NEDETEKTOVÁNO Odpor KAN DETEKTOVÁNO Odpor CAP NENÍ ZJIŠTĚN Odpor ETH NENÍ ZJIŠTĚN	Ve vzorku je přítomen cíl MTB: • Mutace vedoucí k rezistenci na AMK, CAP a ETH nebyly zjištěny. • Mutace přispívající k rezistenci k INH byly zjištěny v jednom nebo více z následujících genů: <i>katG</i>, <i>fabG1</i>, intergenová oblast <i>oxyR-ahpC</i> a promotor <i>inhA</i>. • Mutace přispívající k nízké rezistenci k FLQ byly zjištěny v těchto genech: <i>gyrA</i> • Mutace přispívající k rezistenci vůči KAN byly zjištěny v <i>eis</i> promotorové oblasti • SPC: NA (nepoužije se). Signál SPC není vyžadován, protože zesílení MTB může této kontrole konkurovat. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
MTB NEBYL ZJIŠTĚN	Ve vzorku není detekován cíl MTB: • SPC: PASS. SPC splnilo kritéria přijatelnosti. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.

Výsledek	Výklad
INVALID	Přítomnost nebo nepřítomnost MTB nelze určit. SPC nesplňuje kritéria přijatelnosti, vzorek nebyl správně zpracován nebo došlo k inhibici PCR. Test opakujte. Viz oddíl 16.2. Postup opakování testu v tomto dokumentu. • MTB: INVALID. Přítomnost nebo nepřítomnost MTB DNA nelze určit. • SPC: FAIL. Cílový výsledek MTB je negativní a prahová hodnota cyklu SPC (Ct) není v platném rozsahu. • Kontrola sondy: PASS. Všechny výsledky kontroly sond jsou vyhovující.
CHYBA	Přítomnost nebo nepřítomnost MTB nelze určit. Test opakujte. Viz oddíl 16.2. Postup opakování testu v tomto dokumentu. • MTB: BEZ VÝSLEDKU • SPC: BEZ VÝSLEDKU • Kontrola sondy: FAIL. Všechny výsledky kontroly sondy nebo jeden z nich selhaly. Poznámka Pokud kontrola sondy proběhla úspěšně, může být chyba způsobena selháním systémové komponenty, chybou obsluhy nebo problémem s integritou kazety.
ŽÁDNÝ VÝSLEDEK Poz	Přítomnost nebo nepřítomnost MTB nelze určit. Test opakujte. Viz oddíl 16.2. Postup opakování testu v tomto dokumentu. Výsledek NO RESULT znamená, že nebyl shromážděn dostatek údajů. Operátor například zastavil probíhající zkoušku. • MTB: BEZ VÝSLEDKU • SPC: BEZ VÝSLEDKU • Kontrola sondy: NA (nepoužije se)

Na následujících obrázcích jsou uvedeny reprezentativní výsledky včetně záložky melt peak, které lze očekávat u testu Xpert MTB/ XDR v podrobném uživatelském zobrazení GeneXpert Dx. Nejsou zobrazeny všechny možné kombinace výsledků.

Test Result

Analyte Result

Detail

Melt Peaks

Errors

History

Support

Assay Name

MTB-XDR

Version

3

Test Result

MTB DETECTED;

INH Resistance NOT DETECTED;

FLQ Resistance NOT DETECTED;

AMK Resistance NOT DETECTED;

KAN Resistance NOT DETECTED;

CAP Resistance NOT DETECTED;

ETH Resistance NOT DETECTED

Test Result

Analyte Result

Detail

Melt Peaks

Errors

History

Support

Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height
inhA-melt	76.3	292.5
katG-melt	73.8	107.0
fabG1-melt	71.5	242.0
ahpC-melt	68.7	41.3
gyrA1-melt	76.2	73.9
gyrA2-melt	70.4	75.8
gyrA3-melt	71.0	129.8
gyrB2-melt	69.5	77.8
rrs-melt	75.0	188.7
eis-melt	68.5	145.3
inhA-mut melt		
katG-mut melt		
fabG1-mut melt		
ahpC-mut melt		
gyrA1-mutA melt		
gyrA1-mutB melt		
gyrA1-mutC melt		
gyrA2-mutA melt		
gyrA2-mutB melt		
gyrA3-mutA melt		
gyrA3-mutB melt		
gyrA3-mutC melt		
gyrB2-mut melt		
rrs-mut melt		
eis-mutA melt		
eis-mutB melt		

Obrázek 8. MTB DETEKTOVÁN; INH, FLQ, AMK, KAN, CAP a ETH rezistence NEDETEKTOVÁNA

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR	Version	3			
Test Result	MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED; FLQ Resistance DETECTED; AMK Resistance DETECTED; KAN Resistance DETECTED; CAP Resistance DETECTED; ETH Resistance DETECTED					
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt						
katG-melt						
fabG1-melt						
ahpC-melt						
gyrA1-melt	76.1	90.0				
gyrA2-melt	69.6	39.7				
gyrA3-melt						
gyrB2-melt						
rrs-melt						
eis-melt						
inhA-mut melt	70.9	259.6				
katG-mut melt	68.4	214.0				
fabG1-mut melt	75.9	181.1				
ahpC-mut melt	66.2	68.2				
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt	76.0	125.0				
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt	66.0	103.2				
rrs-mut melt	71.0	125.7				
eis-mutA melt	71.4	163.9				
eis-mutB melt						

Obrázek 9. MTB DETECTED; INH, FLQ, AMK, KAN, CAP a ETH Resistance DETECTED

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name MTB-XDR Version 3						
Test Result MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED; FLQ Resistance NOT DETECTED; AMK Resistance NOT DETECTED; KAN Resistance NOT DETECTED; CAP Resistance NOT DETECTED; ETH Resistance NOT DETECTED						
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature		Melt Peak Height			
inhA-melt	76.6		284.9			
katG-melt	74.0		105.2			
fabG1-melt						
ahpC-melt	69.0		35.4			
gyrA1-melt	76.6		65.2			
gyrA2-melt	70.4		64.9			
gyrA3-melt	71.4		92.2			
gyrB2-melt	69.7		84.7			
rrs-melt	75.3		146.8			
eis-melt	68.7		124.2			
inhA-mut melt						
katG-mut melt						
fabG1-mut melt	75.9		178.0			
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Obrázek 10. MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name MTB-XDR Version 4						
Test Result MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED; FLQ Resistance NOT DETECTED; AMK Resistance INDETERMINATE; KAN Resistance DETECTED; CAP Resistance INDETERMINATE; ETH Resistance DETECTED						
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature		Melt Peak Height			
inhA-melt						
katG-melt						
fabG1-melt	71.5		254.6			
ahpC-melt	68.7		49.4			
gyrA1-melt	76.3		62.9			
gyrA2-melt	70.2		59.8			
gyrA3-melt	71.5		56.5			
gyrB2-melt	69.4		74.8			
rrs-melt						
eis-melt						
inhA-mut melt	70.9		277.7			
katG-mut melt	68.2		157.7			
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt	62.6		46.5			

Obrázek 11. MTB DETEKTOVÁN; INH a KAN rezistence DETEKTOVÁNA; AMK a CAP INDETERMINOVÁNY

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR	Version	3			
Test Result	MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED; Low FLQ Resistance DETECTED; AMK Resistance NOT DETECTED; KAN Resistance NOT DETECTED; CAP Resistance NOT DETECTED; ETH Resistance NOT DETECTED					
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt	76.5	313.1				
katG-melt						
fabG1-melt	71.7	211.5				
ahpC-melt	69.0	47.2				
gyrA1-melt						
gyrA2-melt						
gyrA3-melt						
gyrB2-melt	69.6	81.1				
rrs-melt	75.2	248.1				
eis-melt	68.8	158.2				
inhA-mut melt						
katG-mut melt	68.4	184.6				
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt	72.3	125.0				
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt	76.0	207.9				
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt	76.5	128.0				
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Obrázek 12. MTB DETEKTOVÁNO; INH a nízký odpor FLQ DETEKTOVÁNY

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR	Version	3			
Test Result	MTB DETECTED; INH Resistance DETECTED; FLQ Resistance DETECTED; AMK Resistance DETECTED; KAN Resistance DETECTED; CAP Resistance NOT DETECTED; ETH Resistance NOT DETECTED					
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt	76.6	278.9				
katG-melt						
fabG1-melt	71.7	226.6				
ahpC-melt	69.0	42.9				
gyrA1-melt						
gyrA2-melt						
gyrA3-melt						
gyrB2-melt	69.8	68.7				
rrs-melt	75.3	198.7				
eis-melt						
inhA-mut melt						
katG-mut melt	68.5	204.1				
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt	72.9	88.0				
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt	69.1	113.4				
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt	71.6	183.4				
eis-mutB melt						

Obrázek 13. DETEKCE MTB; DETEKCE rezistence INH, FLQ, AMK a KAN

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR		Version	3		
Test Result	MTB NOT DETECTED					

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt						
katG-melt						
fabG1-melt						
ahpC-melt						
gyrA1-melt						
gyrA2-melt						
gyrA3-melt						
gyrB2-melt						
rrs-melt						
eis-melt						
inhA-mut melt						
katG-mut melt						
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Obrázek 14. MTB NEZJIŠTĚN

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR	Version	3			
Test Result	INVALID					
Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt	76.8	102.1				
katG-melt						
fabG1-melt	71.7	53.1				
ahpC-melt	69.1	34.9				
gyrA1-melt	76.6	71.4				
gyrA2-melt						
gyrA3-melt	71.5	40.7				
gyrB2-melt	70.2	38.9				
rrs-melt						
eis-melt	68.6	109.4				
inhA-mut melt						
katG-mut melt	68.5	49.4				
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Obrázek 15. INVALIDNÍ

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Assay Name	MTB-XDR		Version 3			
Test Result	ERROR					

Test Result	Analyte Result	Detail	Melt Peaks	Errors	History	Support
Analyte Name	Melt Peak Temperature	Melt Peak Height				
inhA-melt						
katG-melt						
fabG1-melt						
ahpC-melt						
gyrA1-melt						
gyrA2-melt						
gyrA3-melt						
gyrB2-melt						
rrs-melt						
eis-melt						
inhA-mut melt						
katG-mut melt						
fabG1-mut melt						
ahpC-mut melt						
gyrA1-mutA melt						
gyrA1-mutB melt						
gyrA1-mutC melt						
gyrA2-mutA melt						
gyrA2-mutB melt						
gyrA3-mutA melt						
gyrA3-mutB melt						
gyrA3-mutC melt						
gyrB2-mut melt						
rrs-mut melt						
eis-mutA melt						
eis-mutB melt						

Obrázek 16. CHYBA

16 Opakované testy

16.1 Důvody pro opakování testu

Pokud se objeví některý z níže uvedených výsledků testu, opakujte test podle pokynů v části 16.2. Postup opakování zkoušky.

- Výsledek **INVALID** znamená, že SPC selhalo. Vzorek nebyl správně zpracován, PCR je inhibována nebo vzorek nebyl správně odebrán.
- Výsledek **ERROR** může být způsoben mimo jiné tím, že selhala kontrola sondy nebo byly překročeny maximální limity tlaku.
- Výsledek **NO RESULT** znamená, že nebyl shromážděn dostatek údajů. Například obsluha zastavila probíhající test nebo došlo k výpadku napájení.
- Výsledek **INDETERMINATE** znamená, že na základě algoritmu testu nebylo možné definitivně rozhodnout o rezistenci k danému léčivu (další vysvětlení viz oddíl 17. Omezení). Opakované testování s jiným vzorkem může, ale nemusí vést k jinému výsledku.

16.2 Postup opakovaného testování

Pro opakovaný test použijte novou kazetu (nepoužívejte znovu kazetu). Pokud máte zbytky sputa (mělo by jich být $\geq 1,0$ ml) nebo rekonstituovaný sediment (mělo by jich být $\geq 0,5$ ml), vždy použijte nový SR k dekontaminaci a zkapalnění sputa před provedením testu. Postupujte podle pokynů pro zpracování vzorku podle oddílu 12.1. Postup pro nezpracované sputum nebo oddíl 12.2. Postup pro dekontaminovaný koncentrovaný sediment sputa.

Pokud je k dispozici dostatečný zbytek vzorku ošetřeného SR, který byl skladován nejdéle 2,5 hodiny při teplotě do 35 °C nebo byl skladován nejdéle 4 hodiny při teplotě 2–8 °C od prvního přidání SR do vzorku, lze zbytek vzorku ošetřeného SR zpracovat pomocí nové kazety. Při opakovaném testování vždy použijte novou kazetu a test spusťte do 30 minut od přidání zpracovaného vzorku do kazety. Viz oddíl 12.3. Příprava kazety.

17 Omezení

- Výkonnost testu Xpert MTB/XDR byla validována pomocí postupů uvedených v této příbalové informaci. Modifikace postupu testu XDR by měly být interpretovány ve spojení s dalšími laboratorními a klinickými údaji, které má lékař k dispozici.
- Výkonnost testu Xpert MTB/XDR závisí na zdatnosti obsluhy a dodržování testovacích postupů. Chyby v postupu testu mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Všichni operátoři přístroje by měli být řádně proškoleni v obsluze přístroje a testu.
- Vyškolený zdravotnický pracovník by měl výsledky testů interpretovat ve spojení s anamnézou pacienta, klinickými příznaky a výsledky dalších diagnostických testů.
- Protože detekce komplexní DNA MTB závisí na počtu organismů přítomných ve vzorku, jsou spolehlivé výsledky testu závislé na správném odběru, manipulaci a skladování vzorku. K chybným výsledkům testu může dojít v důsledku nesprávného odběru vzorku, nedodržení doporučeného postupu odběru, manipulace nebo skladování, technické chyby, záměny vzorku nebo nedostatečné koncentrace výchozího materiálu. Aby se předešlo chybným výsledkům, je nutné pečlivě dodržovat pokyny uvedené v této příbalové informaci.
- Výsledky testu mohou být ovlivněny předchozí nebo současnou antibiotickou léčbou. Proto nelze pomocí tohoto testu hodnotit úspěšnost nebo neúspěšnost léčby, protože DNA může přetrvávat i po léčbě tuberkulózy.
- Pozitivní výsledek testu nemusí nutně znamenat přítomnost životaschopných organismů. Předpokládá však přítomnost DNA komplexu MTB včetně mutací spojených s rezistencí na INH, FLQ, AMK, KAN, CAP a ETH.
- Mutace nebo polymorfismy ve vazebných oblastech primerů nebo sond mohou ovlivnit detekci nových nebo neznámých kmenů XDR-MTB, což může vést k výsledku citlivému na léčivo.
- Test Xpert MTB/XDR nepotvrzuje citlivost na INH, FLQ, AMK, KAN, CAP a ETH, protože mohou existovat jiné mechanismy rezistence než ty, které byly zjištěny testem, a které mohou být spojeny s nedostatečnou klinickou odpovědí na léčbu.
- Testování krve, mozkomíšního moku (CSF), žaludečního aspirátu, stolice, tkáně a moči nebylo pro použití v testu Xpert MTB/XDR hodnoceno.
- Přestože vzorky indukovaného sputa nebyly zahrnuty do hodnocení klinické účinnosti testu Xpert MTB/XDR, byly testovány izotonické nebo hypertonické roztoky, bronchodilatátory a inhalační bronchodilatátory běžně používané při odběru indukovaného sputa, které test neovlivňují. Fyziologický indukční roztok může vést k nedostatečnému počtu získaných organismů a mohl by ovlivnit detekci *M. tuberculosis*.
- Koncentrovaný sediment sputa použitý při hodnocení účinnosti testu Xpert MTB/XDR byl připraven metodou NALC-NaOH popsanou v práci Kenta a Kubici¹¹. Použití jiných metod přípravy sedimentu může změnit výkonnost testu.
- Negativní test nevylučuje možnost izolace komplexní DNA MTB ze vzorku sputa. Test Xpert MTB/XDR lze použít ve spojení s kulturačním vyšetřením mykobakterií, aby se vyřešilo riziko falešně negativních výsledků a aby se získal organismus pro další charakterizaci a testování citlivosti.
- U vzorků s výsledky **MTB Trace DETECTED** při testování pomocí testu Xpert MTB/RIF Ultra se očekává, že budou pod mezí detekce testu MTB/XDR a nedoporučují se pro testování pomocí testu Xpert MTB/XDR.
- Test Xpert MTB/XDR ze své podstaty nerozlišuje mezi jednotlivými druhy MTB-komplexu (tj. *MTB*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. mungi* a *M. orygis*). Kromě toho je třeba provést kultivaci, aby se zjistilo, zda je kromě MTB-komplexu přítomen i kmen NTM.
- V literatuře se uvádí nižší citlivost u pediatrických pacientů vzhledem k difúzní povaze MTB infekce v plicích této skupiny pacientů a obtížím při získávání vhodných vzorků^{16,17}.
- Smíšené infekce s MTB a *M. marinum* mohou vést k **INDETERMINANTNÍM** výsledkům pro FLQ při $>10^4$ CFU/ml *M. marinum* v přítomnosti ≤ 408 CFU/ml MTB.
- Ve vzácných případech mohou primery a sondy *rrs* zkřížené reagovat s mikroby z prostředí nebo mikroflórou sputa, což může vést k **INDETERMINANTNÍM** výsledkům pro AMK, KAN a CAP.

- Test Xpert MTB/XDR určuje rezistenci k ETH spojenou pouze s mutacemi v promotorové oblasti *inhA*. Nepřítomnost mutací v promotorové oblasti *inhA* nevylučuje rezistenci na ETH. Uvádí se, že mutace způsobující rezistenci k ETH jsou přítomny v genomových oblastech, na které se test Xpert MTB/XDR nezaměřuje.¹⁵
- Souvislost mutací v genech *oxyR-ahpC* a *gyrB* s rezistencí k INH, resp. FLQ, nebyla dosud jednoznačně prokázána, nicméně publikované studie uvádějí, že tyto mutace se vyskytují u kmenů rezistentních k INH a FLQ.^{18,19}
- Přítomnost delecí nebo vzácných mutací v některém z cílových genů by mohla vést k **INDETERMINANTNÍM** výsledkům pro konkrétní léčivo.
- V případě vzorků se smíšenou populací citlivých i rezistentních kmenů existuje pravděpodobnost, že test Xpert MTB/XDR nemusí mutaci odhalit, pokud je rezistentní populace přítomna v míře pro test nedetekovatelné.
- U vzorků s velmi nízkou bakteriální náloží nebo u směsi citlivých i rezistentních kmenů nemusí test Xpert MTB/XDR spolehlivě rozlišit mezi nízkou a vysokou rezistencí na FLQ.

18 Klinický výkon

Byly provedeny dvě klinické studie. Klinická výkonnost testu Xpert MTB/XDR byla hodnocena na retrospektivně odebraných zmražených archivovaných nezpracovaných vzorcích sputa a koncentrovaných vzorcích sputového sedimentu v klinické studii 1 a na prospektivních vzorcích sputa a kultivaci MGIT v klinické studii 2.

18.1 Vzorky sputa

Byla provedena zaslepená klinická studie s cílem zhodnotit výkonnost testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s mikrobiologickými a molekulárními referenčními metodami, tj. fenotypovým testováním citlivosti na léčiva (pDST) a sekvenováním, pro detekci rezistence na INH, ETH, FLQ a SLID (AMK, KAN a CAP). Kromě toho se klinické výkony testu Xpert MTB/XDR byl porovnán s testem Xpert MTB/RIF nebo Xpert MTB/RIF Ultra pro detekci MTB. Dvě pracoviště se známou vysokou prevalencí MDR a XDR TBC poskytla zmrazené archivované nezpracované vzorky sputa nebo koncentrovaného sedimentu sputa, o nichž bylo známo, že jsou pozitivní nebo negativní při kultivaci MTB.

Tabulka 5 uvádí citlivost a specifickou testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s pDST pro lékovou rezistenci. Citlivost byla > 90 % pro INH, FLQ a AMK, > 85 % pro KAN a CAP a > 64 % pro ETH; specifická byla > 98 % pro všechna léčiva.

Tabulka 5. Xpert MTB/XDR vs. pDST pro lékovou rezistenci (retrospektivní vzorky)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95%CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	478	244	23	209	2	91.4	87.4 - 94.2	99.1	96.6 - 99.7
FLQ	417	148	11	254	4	93.1	88.0 - 96.1	98.5	96.1 - 99.4
AMK	405	79	7	317	2	91.9	84.1 - 96.0	99.4	97.7 - 99.8
KAN	343	58	8	276	1	87.9	77.9 - 93.7	99.6	98.0 - 99.9
CAP	167	21	4	142	0	84.0	65.3 - 93.6	100.0	97.4 - 100.0
ETH	230	75	41	112	2	64.7 ^a	55.6 - 72.8	98.3	93.8 - 99.5

^a Hlášení rezistence k ETH je založeno pouze na detekci mutací promotoru *inhA*, což vede k nižší citlivosti.

Tabulka 6 uvádí citlivost a specifickou testu Xpert MTB/XDR ve srovnání se sekvenováním pro rezistenci k léčivům. Citlivost byla > 93 % pro FLQ a vyšší než 96 % pro INH, AMK, KAN, CAP a ETH; specifická byla 100,0 % pro všechna léčiva uvedená v tabulce s výjimkou INH, která byla 98,7 %.

Tabulka 6. Xpert MTB/XDR vs. sekvenování na rezistenci k léčivům (retrospektivní vzorky)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95%CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	471	241	3	224	3	98.8	96.5 - 99.6	98.7	96.2 - 99.5
FLQ	469	152	11	306	0	93.3	88.3 - 96.2	100.0	98.8 - 100.0
AMK	463	81	3	379	0	96.4	90.0 - 98.8	100.0	99.0 - 100.0
KAN	463	88	3	372	0	96.7	90.8 - 98.9	100.0	99.0 - 100.0
CAP	463	78	3	382	0	96.3	89.7 - 98.7	100.0	99.0 - 100.0
ETH	473	104	3	366	0	97.2	92.1 - 99.0	100.0	99.0 - 100.0

Tabulka 7 ukazuje, že pozitivní procentuální shoda (PPA) testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s testem Xpert MTB/RIF pro detekci MTB činí 98,9 % a negativní procentuální shoda (NPA) 93,8 %.

Tabulka 7. Xpert MTB/XDR vs. Xpert MTB/RIF Assay pro detekci MTB

		Test Xpert MTB/RIF		
		Zjištěno MTB	MTB nezjištěn	Celkem
Xpert MTB/XDR	Zjištěno MTB	273	2a	275
	MTB nezjištěn	3b	30	33
	Celkem	276	32	308
PPA		98,9 % (95%CI: 96,9-99,6)		
NPA		93,8 % (95%CI: 79,9-98,3)		

a Subjekty byly v době odběru vzorku dlouhodobě léčeny TBC.

b Vzorky byly detekovány pod mezí detekce testu Xpert MTB/XDR.

Tabulka 8 ukazuje, že PPA a NPA testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s testem Xpert MTB/RIF Ultra pro detekci MTB činí 99,5 %, resp. 100,0 %.

Tabulka 8. Xpert MTB/XDR vs. Xpert MTB/RIF Ultra pro detekci MTB

		Xpert MTB/RIF Ultra		
		Zjištěno MTB	MTB nezjištěn	Celkem
Xpert MTB/XDR	Zjištěno MTB	207	0	207
	MTB nezjištěn	1a	14	15
	Celkem	208	14	222
PPA		99,5 % (95%CI: 97,3-99,9)		
NPA		100,0 % (95%CI: 78,5-100,0)		

a Výsledek testu Xpert MTB/RIF Ultra byl **MTB Trace Detected**.

Z 531 testů Xpert MTB/XDR provedených v souvislosti s touto studií poskytlo 15 testů při prvním pokusu neurčité výsledky (**ERROR**, **INVALID** nebo **NO RESULT**). Při opakovaném testování těchto 15 vzorků zůstal jeden výsledek neurčitý. Míra neurčitosti při prvním testu byla 2,8 % (15/531) a míra neurčitosti při závěrečném testu byla 0,2 % (1/531).

Byla provedena multicentrická klinická studie (klinická studie 2), která hodnotila výkonnost testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s pDST a sekvenováním při detekci rezistence k INH, ETH, FLQ a SLID (AMK, KAN a CAP) ve vzorcích sputa. Do studie byly zařazeny prospektivně odebrané vzorky sputa ze čtyř míst se známým vysokým výskytem MDR TB. Nezpracované vzorky sputa a vzorky izolátů kultury MGIT, o nichž bylo známo, že jsou pozitivní na kultivaci MTB, byly analyzovány na rezistenci k léčivům.

Tabulka 9 uvádí citlivost a specifickou testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s pDST pro všechny lékové rezistence ve vzorcích sputa. Citlivost byla > 90 % pro INH, FLQ a KAN, > 85 % pro AMK, > 70 % pro CAP a > 50 % pro ETH. Specifická byla ≥ 92 % pro všechny léky.

Tabulka 9. Xpert MTB/XDR vs. pDST pro lékovou rezistenci (prospektivní vzorky)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95% CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	587	452	24	106	5	95.0	92.6- 96.6	95.5	89.9- 98.1
FLQ	583	203	13	347	20	94.0	90.0- 96.4	94.6 ^a	91.7- 96.4
AMK	571	54	9	500	8	85.7	75.0- 92.3	98.4	96.9- 99.2
KAN	573	155	14	372	32	91.7	86.6- 95.0	92.1 ^b	89.0- 94.3
CAP	573	50	17	503	3	74.6	63.1- 83.5	99.4	98.3- 99.8
ETH	588	169	148	258	13	53.3 ^c	47.8- 58.7	95.2	92.0- 97.2

^a Několik vzorků s mutacemi A90V/S91P/D94A v genu *gyrA* bylo detekováno jako citlivé pomocí pDST a rezistentní pomocí testu, což vedlo k nižší specifitě.

^b Několik vzorků s mutací promotoru *eis* a divokým typem genu *rrs* bylo detekováno jako citlivé pomocí pDST a rezistentní pomocí testu, což vedlo k nižší specifitě.

^c Hlášení rezistence k ETH je založeno pouze na detekci mutací promotoru *inhA*, což vede k nižší citlivosti.

Tabulka 10 uvádí citlivost a specifickou testu Xpert MTB/XDR ve srovnání se sekvenováním pro všechny lékové rezistence ve vzorcích sputa. Citlivost byla >90 % pro INH, FLQ a KAN (zaokrouhleno nahoru z 89,5 %), >70 % pro AMK, >65 % pro CAP a >95 % pro ETH. Specifická byla ≥ 98 % pro všechny léky.

Tabulka 10. Xpert MTB/XDR vs. sekvenování pro stanovení rezistence k léčivům (prospektivní vzorky)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95% CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	515	411	17	85	2	96.0	93.7- 97.5	97.7	92- 99.4
FLQ	513	201	6	303	3	97.1	93.8- 98.7	99.0	97.2- 99.7
AMK	501	50	18	430	3	73.5	62- 82.5	99.3	98- 99.8
KAN	503	170	20	308	5	89.5	84.3- 93.1	98.4	96.3- 99.3
CAP	504	45	23	435	1	66.2	54.3- 76.3	99.8	98.7- 100
ETH	517	160	6	347	4	96.4	92.3- 98.3	98.9	97.1- 99.6

18.2 Vzorky MGIT

Byla provedena multicentrická klinická studie (klinická studie 2), která rovněž hodnotila výkonnost testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s pDST a sekvenováním pro detekci rezistence k INH, ETH, FLQ a SLID (AMK, KAN a CAP) u vzorků pozitivních na MTB. Do studie byly zařazeny prospektivně odebrané vzorky sputa ze čtyř míst se známým vysokým výskytem MDR TB. Nezpracované vzorky sputa a kultivační izoláty MGIT od každého subjektu byly testovány přístrojem Xpert MTB/XDR. Po přímém testování pomocí Xpert MTB/XDR byly dekontaminované a koncentrované vzorky sputa inokulovány do kultivačních médií MGIT a inkubovány na pozitivní růst MTB. Pozitivní izoláty z kultury MGIT byly testovány pomocí testu Xpert MTB/XDR. Izoláty kultury MGIT byly před testováním skladovány při teplotě 2-8 °C a většina vzorků (96,9 %) byla testována do 2 měsíců od positivity kultury MGIT.

Tabulka 11 uvádí citlivost a specifičnost testu Xpert MTB/XDR ve srovnání s pDST pro všechny lékové rezistence. Citlivost byla > 90 % pro INH, FLQ a KAN, > 85 % pro AMK, > 75 % pro CAP a 55 % pro ETH. Specifičnost byla ≥ 92 % pro všechny léky.

Tabulka 11. Xpert MTB/XDR vs. pDST pro lékovou rezistenci (pozitivní kultivace MGIT)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95% CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	596	459	23	109	5	95.2	92.9- 96.8	95.6	90.1- 98.1
FLQ	594	208	12	356	18	94.5	90.7- 96.9	95.2	92.5- 96.9
AMK	593	57	8	520	8	87.7	77.5- 93.6	98.5	97.0- 99.2
KAN	594	163	11	388	32	93.7	89.0- 96.4	92.4 ^a	89.4- 94.6
CAP	595	52	17	524	2	75.4	64.0- 84.0	99.6	98.6- 99.9
ETH	597	177	145	258	17	55.0	49.5- 60.3	93.8	90.3- 96.1

^a Několik vzorků s mutací promotoru *eis* a divokým typem genu *rrs* bylo detekováno jako citlivé pomocí pDST a rezistentní pomocí testu, což vedlo k nižší specifičnosti.

Tabulka 12 uvádí citlivost a specifičnost testu Xpert MTB/XDR ve srovnání se sekvenováním pro rezistenci k léčivům. Citlivost byla > 96 % pro INH, FLQ a ETH, > 85 % pro KAN, > 70 % pro AMK a > 62 % pro CAP. Specifičnost byla u všech léčiv ≥ 97 %.

Tabulka 12. Xpert MTB/XDR vs. sekvenování pro lékovou rezistenci (pozitivní kultivace MGIT)

Drogy	N	TP	FN	TN	FP	Citlivost (%)	95% CI	Specifičnost (%)	95% CI
INH	522	418	15	88	1	96.5	94.4- 97.9	98.9	93.9- 99.8
FLQ	521	205	5	309	2	97.6	94.5- 99.0	99.4	97.7- 99.8
AMK	520	52	20	446	2	72.2	61.0-81.2	99.6	98.4- 99.9
KAN	520	177	20	319	4	89.8	84.8- 93.3	98.8	96.9- 99.5
CAP	522	45	27	450	0	62.5	51.0- 72.8	100.0	99.2- 100.0
ETH	523	167	4	344	8	97.7	94.1- 99.1	97.7	95.6- 98.8

Z 1211 testů Xpert MTB/XDR provedených v této studii (606 na vzorcích sputa, 605 na vzorcích MGIT) bylo 35 testů s neurčitým výsledkem. Při opakovaném testování těchto 35 vzorků zůstaly dva vzorky neurčité. Míra neurčitosti při prvním testu byla 2,9 % (35/1211) a míra neurčitosti při konečném testu byla 0,2 % (2/1211).

19 Analytický výkon

19.1 Analytická citlivost (mez detekce)

Byly provedeny studie ke stanovení analytického limitu detekce (LoD) testu Xpert MTB/XDR se dvěma šaržemi reagentů během tří testovacích dnů. Pozitivní výsledek testu MTB je založen na detekci jedné kopie *inhA* terče. Pro ověření byla vybrána vyšší LoD zjištěná pro kmen a šarži, jak bylo určeno probitovou analýzou. Ověření odhadovaného tvrzení LoD bylo provedeno na jedné šarži činidla během minimálně tří testovacích dnů. LoD byla stanovena pomocí *reprezentativního člena MTBC, Mycobacterium bovis BCG (Bacille Calmette-Guerin)*, který byl naspikován do MTB negativního, nezpracovaného sputa a do MTB negativního, koncentrovaného sputa.

LoD je nejnižší uváděná koncentrace v CFU/ml, kterou lze reprodukovatelně odlišit od negativních vzorků s ≥ 95% spolehlivostí. Replikáty 20 byly vyhodnoceny v pěti až osmi koncentracích se dvěma různými šaržemi činidel v průběhu 3 dnů a LoD byla stanovena pomocí Probitovy analýzy.

Pro ověření byla vybrána vyšší LoD zjištěná pro každý typ vzorku a šarži, jak bylo určeno probitovou analýzou. Ověření odhadovaného tvrzení LoD bylo provedeno na jedné šarži činidla v průběhu minimálně tří testovacích dnů s tvrzením založeným na minimálně 19 z 20 pozitivních replikátů. Bodové odhady LoD v CFU/ml jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13. Analytická citlivost (mez detekce)

Typ vzorku	Odhad bodu LoD, CFU/ml
Nezpracované sputum	136
Sediment	86

19.2 Analytická specifita (exkluzivita)

Analytická specifita testu Xpert MTB/XDR byla hodnocena testováním panelu 57 organismů sestávajícího z 21 bakterií, 1 plísně, 7 virů a 28 netuberkulózních mykobakterií (NTM), které představují běžné respirační patogeny nebo patogeny, které se mohou vyskytovat v respiračním traktu a/nebo orofaryngeální flóře. Tři repliky každé bakterie a kmeny kvasinek byly testovány v koncentracích $\geq 1 \times 10^6$ CFU/ml. Všechny viry byly testovány v koncentraci $\geq 1 \times 10^5$ (Tissue Culture Infectious Dose) TCID₅₀ /ml. DNA nebo RNA byly testovány u 2 bakteriálních a 1 plísňového kmene v koncentracích ≥ 106 kopií/ml, jak je uvedeno v tabulce.

celé organismy nebyly k dispozici nebo k nim nebylo možné získat přístup z důvodu omezení biologické bezpečnosti. Byly testovány tři replikáty každého viru v koncentracích $\geq 1 \times 10^5$ TCID₅₀ /ml. Analytická specifita byla 100 %. Testované organismy jsou uvedeny v tabulkách 14, 15 a 16. U žádného z testovaných organismů nedošlo ke zkřížené reaktivitě s detekční sondou MTB, což generovalo výsledek **MTB NOT DETECTED** pro všechny organismy a pro všechny testované repliky. V následujících tabulkách jsou uvedeny organismy testované pro test analytické specifity. *Aspergillus fumigatus* byl analyticky testován a nevykazoval žádné interference ani zkříženou reaktivitu. Křížová reaktivita s žádným jiným druhem houby není analýzou *in silico* zřejmá.

Tabulka 14. Analytická specifita testu Xpert MTB/XDR (bakterie/houby)

Organismus
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Chlamydomonas pneumoniae</i> ^a
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> ^a
<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Asteroidy Nocardia</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Streptococcus mitis</i>

<i>Streptococcus mutans</i>

Organism us
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> ^a

^a Genomová DNA

Tabulka 15. Analytická specifita testu Xpert MTB/XDR (viry)

Organism us
Koronavirus 229E
Lidský metapneumovirus (hMPV) 16 typ A1
Virus parainfluenzy typu 1
Virus parainfluenzy typu 2
Virus parainfluenzy typu 3
Respirační syncytiální virus
Rhinovirus 1A

Tabulka 16. Analytická specifita testu Xpert MTB/XDR (NTM)

Organism us
<i>Mycobacterium asiaticum</i>
<i>Mycobacterium avium</i> NJH
<i>Mycobacterium celatum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>Fortuitum</i>
<i>Mycobacterium gastri</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i> (3 kmeny. Viz tabulka 20.)
<i>Mycobacterium genavense</i>
<i>Mycobacterium haemophilum</i>
<i>Mycobacterium malmoeense</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium szulgai</i>
<i>Mycobacterium terrae</i>
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>
<i>Mycobacterium triviale</i>

Mycobacterium vaccae

Organism us
<i>Mycobacterium xenopi</i>
<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>

19.3 Analytická reaktivita (inkluzivita)

Analytická reaktivita (inkluzivita) testu Xpert MTB/XDR byla hodnocena pomocí fylogeneticky různorodého panelu složeného z citlivých a rezistentních kmenů MTB, aby bylo možné vyhodnotit přesnost výsledků testu citlivosti na léčiva. Panel dvaadvaceti (22) kmenů MTB-komplexu (MTBC) zahrnoval osm (8) kmenů citlivých na léčiva s cílovými geny divokého typu (tabulka 17) a čtrnáct (14) dobře charakterizovaných kmenů rezistentních na léčiva (tabulka 18). Všechny kmeny byly testovány ve třech opakováních při koncentracích na úrovni 3 X LoD cílového promotoru *inhA* nebo blízko této hodnoty. Počet kopií testovaných lyzátů genomové DNA byl založen na testu vazby fluorescenčního barviva specifického pro dvouřetězcovou DNA (dsDNA).

Byly testovány kmeny citlivé na léčiva, které zahrnují pět kmenů MTB (AR2, GD139, AH1, HR36, H37Rv) a tři druhy komplexních mykobakterií MTB (*M. bovis*, *M. canetti* a *M. microti*). Kmeny MTB byly vybrány tak, aby široce reprezentovaly rozsah genetické diverzity a zahrnovaly jednoho zástupce z každé z hlavních fylogenetických linií na základě skupin SNP-klastrů (SCG)²⁰.

14 kmenů MTB rezistentních vůči lékům bylo testováno pomocí lyzátů genomové DNA z dobře charakterizovaných vzorků, které obsahují 16 klinicky významných kanonických mutací s alespoň jednou z každé z osmi oblastí, na které se test zaměřuje. Tyto mutace jsou běžně přítomny u multirezistentních nebo extenzivně rezistentních kmenů MTB po celém světě s výjimkou mutace v genu *gyrB*.

Tabulka 17 shrnuje výsledky s kmeny citlivými na léčiva a uvádí počet správných výsledků pro jednotlivé analyty v testu. Všichni členové panelu získali výsledky **MTB DETECTED; RESISTANCE NOT DETECTED**. Test Xpert MTB/ XDR správně identifikoval všechny replikáty testovaných kmenů blízko meze detekce s výsledky divokého typu pro všechny sondy kromě *oxyR-ahpC*. Vzhledem k tomu, že cíl *oxyR-ahpC* má vyšší LoD než ostatní cíle v testu, některé testované replikáty neposkytly výsledky Tm.

Výsledky v tabulce 18 ukazují, že test také správně identifikoval očekávané mutace rezistence u všech 14 kmenů rezistentních k isoniazidu s mutacemi v promotoru *inhA*, *katG* a intergenové oblasti *oxyR-ahpC*; rezistence k SLIDs s mutacemi *rrs* a promotorové oblasti *eis*; a rezistence k FLQ s mutacemi v *gyrA*.

Tabulka 17. Analytická reaktivita (inkluzivita) pro kmeny citlivé na léčiva

Ukázka	Rodok men kmene	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	<i>fabG1</i>	<i>oxyR- ahpC</i> ^a	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>gyrA3</i>	<i>gyrB2</i>	<i>rrs</i>	<i>eis</i>
(<i>M.bovis</i> BCG)	Nepříděleno	PASS	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>M.bovis</i>	Nepříděleno	PASS	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
MTB (AR2)	2	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
MTB (GD139)	3	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
MTB (AH1)	4	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
MTB (HR36)	5	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
MTB (HR37Rv)	4	PASS	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>M.canetti</i>	Nepříděleno	PASS	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

Ukázka	Rodok men kmene	inhA	katG	fabG1	oxyR-ahpC ^a	gyrA1	gyrA2	gyrA3	gyrB2	rrs	eis
M.microti	Nepři děleno	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS

^a LoD pro *oxyR-ahpC* je vyšší než pro *inhA*, který se používá pro stanovení pozitivitu MTB. "PASS" označuje, že všechny testované replikáty generovaly očekávané hodnoty T_m divokého typu; "FAIL" označuje, že alespoň jeden nebo více replikátů negenerovaly žádné hodnoty T_m.

Tabulka 18. Analytická reaktivita (inkluzivita) pro kmeny rezistentní vůči léčivům (# pozitivní výsledky / celkový počet testovaných)

ID kmene	Gene	Očekávaná mutace	MTB Zjištěno	Zjištěné mutantní sondy T _m (# pozitivní/testováno)	Správné volání RESISTANCE DETECTED (# pozitivní/testováno)
Klinický	gyrA	GAC 94 TAC	3 / 3	gyrA1-MutB (3/3); gyrA3-MutC (3/3)	FLQ [3/3]
	katG	AGC 315 ACC		katG Mut (3/3)	INH [3/3]
	fabG1	G609A		fabG1 Mut (3/3)	INH [3/3]
Klinický	gyrA	GGC 88 GCC, GCG 90 GTG, TCG 91 CCG	3 / 3	gyrA1-MutB (2/3), ^a gyrA1-MutC (2/3), gyrA2-MutA (3/3), gyrA3-MutB (1/3)	FLQ [3/3]
	katG	AGC 315 ACC		katG Mut (3/3)	INH [3/3]
	rrs	A1401G		rrs-Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]
Klinický	gyrA	GAC 94 GGC	3 / 3	gyrA3-MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	katG	AGC 315 ACC		katG Mut (3/3)	INH [3/3]
	rrs	A1401G		rrs-Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]
14-14194	gyrA	GAC 94 GCC	3 / 3	gyrA1-MutA, gyrA2-MutA	FLQ [3/3]
	katG	AGC 315 ACC		katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
15-14175	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	eis	-10G/A		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
15-14191	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	eis	-10G/A		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
16-05612	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
	eis	-12C/T		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]
16-05613	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
	eis	-12C/T		eis-Mut (3/3)	KAN [3/3]

14-13764	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]
	ahpC	-48G/A		ahpc-Mut (3/3)	INH [3/3]
14-13806	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG-Mut (3/3)	INH [3/3]

ID kmene	Gene	Očekávaná mutace	MTB Zjištěno	Zjištěné mutantní sondy T _m (# pozitivní/testováno)	Správné volání RESISTANCE DETECTED (# pozitivní/testováno)
	ahpC	-48G/A		ahpC-Mut (3/3)	INH [3/3]
Klinický	gyrA	GCG 90 GTG, GAC 94 GGC	3 / 3	gyrA3-MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA-Mut (3/3)	INH [3/3]
	ahpC	G-6A		ahpC (2/3) ^b	INH [3/3]
Klinický	katG	AGC 315 ACC	3 / 3	katG Mut (3/3)	INH [3/3]
Klinický	gyrB2	ACC 539 AAC	3 / 3	gyrB2 WT ^c	*Nezjištěn žádný odpor [0/3]
	rrs	A1401G		rrs-Mut (3/3)	AMK, CAP, KAN [3/3]
	gyrA	GCG 90 GTG		gyrA1 MuB (3/3), gyrA2 MutA (3/3), gyrA3 MutB (3/3)	FLQ [3/3]
	ahpC	g -6 a		ahpC Mut (3/3)	INH [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]
Klinický	gyrA	TCG 91 CCG	3 / 3	gyrA1-MutB (3/3), gyrA2-MutA (3/3), gyrA3-MutC (3/3)	FLQ [3/3]
	inhA	C -15 T		inhA Mut (3/3)	INH, ETH [3/3]

^a Tento vzorek obsahující tři různé mutace v genu *gyrA* nevytvořil vždy mutantní T_ms pro všechny tři sondy *gyrA*. Aby však bylo provedeno správné volání rezistence, musí alespoň jedna sonda generovat mutantní T_m, volání bylo správně provedeno pro všechny replikáty, protože alespoň jedna sonda *gyrA* vždy při testování generovala alespoň jednu mutantní T_m.

^b Tento vzorek je dvojitý mutant katG / ahpC. Replikace s chybějící mutací ahpC T_m byla nazvána INH-R kvůli přítomnosti mutace katG, která byla testem detekována.

^c Tato specifická mutace není testem detekována. Existují však omezené klinické důkazy, že tato mutace může skutečně přispívat k rezistenci na FLQ (Low confidence mutation for FLQ-Resistance).

19.4 Studie o rušivých látkách

Výkonnost testu Xpert MTB/XDR byla hodnocena v přítomnosti 35 potenciálně interferujících látek, které mohou být přítomny ve sputu. Třídy potenciálně interferujících látek zahrnují endogenní látky, které mohou být přítomny ve vzorku, a exogenní látky, které mohou být do vzorku vneseny. Byly testovány izotonické nebo hypertonické roztoky, bronchodilatancia a inhalační bronchodilatancia, které se běžně používají při odběru indukovaného sputa a které nejsou zasahovat do testu. Indukce fyziologickým roztokem může vést k nedostatečnému počtu získaných organismů a může ovlivnit detekci *M. tuberculosis*.

Testované látky jsou uvedeny v tabulce 19 s účinnými látkami a testovanými koncentracemi. Negativní vzorky (n = 8) byly testovány pro každou látku, aby se zjistil vliv na výkonnost kontroly zpracování vzorku (SPC). Na každou látku byly testovány pozitivní vzorky (n = 8) *Mycobacterium bovis*, *Bacille Calmette-Guerin (BCG)* s příměsí na úrovni 3x analytického limitu detekce pro pozitivitu TBC. Všechny látky byly testovány na MTB negativním sdruženém pozadí lidského sputa zahrnutého do této studie. Všechny pozitivní a negativní replikáty byly správně identifikovány pomocí testu Xpert MTB/XDR, s výjimkou gelu Zicam (50 % w/v; výsledek **MTB NOT DETECTED** v 11,1 % testovaných replikátů).

Tabulka 19. Potenciálně interferující látky v testu Xpert MTB/XDR

Látka/třída	Popis / účinná látka	Testovaná koncentrace
-------------	----------------------	-----------------------

Látka/třída	Popis / účinná látka	Testovaná koncentrace
Krev (lidská)	Krev 5% (obj.)	5 % (v/v)
Lidská DNA/buňky	Buněčná linie HELA 229	10 ⁶ buněk/ml
Bílé krvinky (lidské)	Matrice WBC/Pus (30 % buffy coat; 30 % plazmy; 40 % PBS)^	100% (v/v)
Antimykotikum; antibiotikum	Nystatin 500KU (100%)	20% (v/v)
Germicidní ústní voda	Chlorhexidin glukonát (0,12%), ústní výplach, USP	20% (v/v)
Reagencie pro zpracování vzorků	Cetylpyridiniumchlorid, 1% v 2% NaCl	0,5 % (v/v) v 1 % NaCl
Reagencie pro zpracování vzorků	Cetylpyridiniumchlorid, 1% v 2% NALC	0,5 % (v/v) v 1 % NALC
Reagencie pro zpracování vzorků	Cetylpyridiniumchlorid, 1 % v 2% NALC plus 25 mM citrát	0,5 % (v/v) v 1 % NALC plus 12,5 mM citrát
Žaludeční kyselina	pH 3 až 4 roztok ve vodě, neutralizovaný hydrogenuhličitanem sodným	100% (v/v)
Anestetika (endotracheální intubace)	Lidokain HCl 4%	4% (v/v)
Nebulizační roztoky	NaCl 5% (w/v)	5% (w/v)
Mucin	Mucin 5% (w/v)	5% (w/v)
Antibakteriální, systémové	Levofloxacin 25 mg/ml	5 mg/ml
Nosní kortikosteroidy	Flutikason 500 mcg/sprej	5 µg/ml;
Inhalační bronchodilatancia	Albuterol sulfát (2 mg/5 ml)	100 µg/ml
Ústní anestetika	Orajel (20% benzokain)	5% (w/v)
Antivirové léky	Acyklovir	50 µg/ml
Antibiotika, nosní mast	Neosporin (400U Bactracin, 3,5 mg neomycinu, 5000U polymyxinu B)	5% (w/v)
Tabák	Nicogel 40% tabákový extrakt	0.5%
Léky proti tuberkulóze	Streptomycin 1mg/ml	25 µg/ml
Léky proti tuberkulóze	Ethambutol 1mg/ml	50 µg/ml
Léky proti tuberkulóze	Isoniazid 50mg/5ml	50 µg/ml
Perorální expektorancia	Guaifenesin (400 mg/tableta)	5 mg/ml
Léky proti tuberkulóze	Pyrazinamid (500 mg/tableta)	100 µg/ml
Nosní gel (homeopatický)	Zicam gel	50% (w/v)
		20% (w/v)
Nosní sprej	Fenylefrin 1%	0,5 % (v/v)
Léky proti tuberkulóze	Rifampicin (300 mg/tableta)	25 µg/ml

Lék na zmírnění alergie (homeopatický)	100% čistý čajovníkový olej (<5 % cineolu, >35 % terpinen-4-ol)	0,5 % (v/v)
---	---	-------------

Látka/třída	Popis / účinná látka	Testovaná koncentrace
Nebulizační roztoky	Pentamidin isethionát	300 ng/ml
Léky proti tuberkulóze	Amoxicilin	25 µg/ml
Bronchodilatancia	Epinefrin	1mg/ml
Léky proti tuberkulóze	Amikacin	70ug/ml
Léky proti tuberkulóze	Kapreomycin	50ug/ml
Léky proti tuberkulóze	Kanamycin	50ug/ml
Léky proti tuberkulóze	Ethionamid	50ug/ml
Chřipková mlha Qual Nasal	Vakcína proti viru chřipky živá-nasální	5%

19.5 Studie přenesené kontaminace

Byla provedena studie, která prokázala, že při použití jednorázových samostatných kazet Xpert MTB/XDR nedochází ke křížové kontaminaci. Studie spočívala ve zpracování negativního vzorku bezprostředně po zpracování vysoké koncentrace *Mycobacterium bovis-Bacille Calmette-Guerin* (BCG) o koncentraci $1 \times 10^{+6}$ CFU/ml v lidském sputu stejným modulem Xpert Gene. Toto testovací schéma bylo opakováno nejméně 20krát ve dvou modulech GeneXpert, čímž bylo získáno celkem 41 testů s výsledkem 20 pozitivních a 21 negativních výsledků na modul.

Všech 20 pozitivních vzorků bylo správně hlášeno jako **MTB DETECTED; INH rezistence NENÍ DETECTED; FLQ rezistence NENÍ DETECTED; AMK rezistence NENÍ DETECTED; KAN rezistence NENÍ DETECTED; CAP rezistence NENÍ DETECTED; ETH rezistence NENÍ DETECTED**. Všech 21 negativních vzorků bylo správně nahlášeno jako **MTB NOT DETECTED**. V podmínkách této studie nebyl při testování s velmi pozitivním vzorkem BCG o koncentraci $1,0 \times 10^{+6}$ CFU/ml prokázán žádný přenos kontaminace.

19.6 Studie konkurenčního rušení

Konkurenční interference testu způsobená přítomností vysokých koncentrací netuberkulózních mykobakterií (NTM) na detekci nízkých hladin MTB v testu Xpert MTB/XDR byla hodnocena testováním reprezentativního člena MTBC. BCG v koncentraci $\sim 3 \times \text{LoD}$ (411 CFU/ml) v přítomnosti různých kmenů NTM v koncentraci $1 \times 10E+06$ CFU/ml na pozadí negativního kontrolního pufru. Pozitivita MTB je založena na detekci promotoru *inhA* platné výšky píku tání a teploty píku tání. Detekce rezistence je založena na platné výšce píku tání mut a teplotě píku tání mut pro jednotlivé analyty (*inhA*, *katG*, *gyrA1*, *gyrA2*, *gyrA3*, *gyrB2* a *eis*). *oxyR-ahpC* a *fabG1* analyty byly vyloučeny kvůli nižší citlivosti a *rrs* byl vyloučen kvůli známé interferenci s mikroflórou. Všechny vzorky obsahující BCG měly mít výsledky jako **MTB DETECTED; INH rezistence NEDETECTED; FLQ rezistence NEDETECTED; AMK rezistence NEDETECTED; KAN rezistence NEDETECTED; CAP rezistence NEDETECTED; ETH rezistence NEDETECTED**.

Byly testovány čtyři opakování každé podmínky testu kompetitivní směsi NTM/ BCG spolu s pozitivní kontrolou pouze s BCG v koncentraci $\sim 3 \times \text{LoD}$. Žádný z testovaných kmenů NTM neinterferoval s detekcí 411 CFU/ml BCG a poskytl správný výsledek, jak je uvedeno výše. Za podmínek této studie však byly pozorovány kompetitivní inhibiční účinky v přítomnosti pouze jednoho ze dvou testovaných kmenů *M. marinum* (ATCC 0927). Interference se sondami *gyrA2* byla pozorována pouze při koncentracích výzvy $>10^4$ CFU/ml, což vedlo k volání FLQ rezistence INDETERMINATE při těchto vysokých koncentracích výzvy. Viz oddíl 17. Omezení pro další informace.

Tabulka 20. Konkurenční interference NTM při detekci MTB a detekci citlivosti na léčiva

Podmínky testu / ID kmene NTM	NTM CFU/ml	MTB Zjištěno	INH	FLQ	AMK	KAN	CAP	ETH
<i>MTB + M. avium</i> / (NJH)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.gastir</i> / (ATCC 15754)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.gordonae</i> / (NJH)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.gordonae</i> / (ATCC 14470)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.gordonae</i> / (ATCC 35760)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.marinum</i> / (NJH)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.marinum</i> / (ATCC 0927)	10E+06	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS
	10E+05	PASS	PASS	FAIL	PASS	PASS	PASS	PASS
	10E+04	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
	10E+03	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.xenopi</i> / (ATCC 700084)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.avian</i> / (ATCC 15769)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.intracellulare</i> / (ATCC 35771)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.abscessus</i> / (ATCC 19977)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
<i>MTB + M.kansasii</i> / (ATCC 12478)	10E+06	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS	PASS
"PASS" znamená, že všechny testované replikáty přinesly očekávaný výsledek "RESISTANCE NOT DETECTED" pro příslušné léčivé látky; "FAIL" znamená, že alespoň jedna nebo více replikací vygenerovaly výsledek "RESISTANCE INDETERMINATE" pro danou látku.								

19.7 Ekvivalence čerstvého a zmrazeného sputa

Ekvivalence čerstvého a zmrazeného sputa s testem Xpert MTB/XDR byla hodnocena testováním buněk *M.bovis* - Bacillus Calmette- Guerin (BCG) na pozadí směsného MTB negativního nezpracovaného sputa ve dvou koncentracích představujících 3X LoD (400 CFU/ml) a 1000XLoD ($1,3 \times 10^5$ CFU/ml). Replikáty vzorků v každé koncentraci byly zmrazeny a skladovány při -80 °C a nejméně 8 replikátů bylo testováno po skladování po 1 týdnu, 2 týdnech, 1 měsíci, 3 měsících, 6 měsících a 9 měsících. Výsledky byly porovnány s nezpracovaným sputem obohaceným o stejnou koncentraci testované v nulovém časovém bodě před zmrazením.

Výkonnost testu nebyla ovlivněna a správné výsledky byly získány u všech testovaných replikátů při 3x LoD po skladování při -80 °C po 2 týdnech, 3 měsících a 6 měsících. Jedna replikace v časovém bodě 1. týdne přinesla výsledek **INH-Resistance Indeterminate** kvůli vypadnutí sondy *katG* a jedna replikace v 1. měsíci měla za následek vypadnutí *ahpC*, ale u všech replikátů ve 3. a 6. měsíci byly pozorovány správné výsledky. Správné výsledky byly získány v časovém bodě 9 měsíců při 3X LoD u 8 z 9 replikátů (89 %). Nebyl pozorován žádný vliv na výkon testu, když bylo sputum s 1000X LoD skladováno při -80 °C ve všech testovaných časových bodech, i když 9 měsíců. Výsledky této studie podporují skladování nezpracovaného sputa ve zmrazeném stavu při 80 °C po dobu až 6 měsíců.

19.8 Inaktivace mykobakterií ve vzorcích sputa

Dezinfekční schopnost činidla pro vzorky Xpert MTB byla stanovena pomocí standardizované kvantitativní tuberkulocidní kultivační metody.²¹ Vzorky sputa byly obohaceny o vysokou koncentraci životaschopného *M. bovis*, smíchány s činidlem pro vzorky v poměru 2:1 a inkubovány po dobu 15 minut. Po inkubaci byla směs činidla vzorku a sputa neutralizována zředěním a filtrací a poté kultivována. Životaschopnost organismů *M. bovis* z ošetřeného sputa byla snížena nejméně o 6 logů ve srovnání s neošetřenou kontrolou.

Každá laboratoř musí stanovit účinnost dezinfekčních vlastností činidla pro vzorky pomocí vlastních standardizovaných metod a musí dodržovat doporučené předpisy o biologické bezpečnosti.

20 Přesnost a reprodukovatelnost

Přesnost a reprodukovatelnost testu Xpert MTB/XDR byla stanovena v multicentrické (tři pracoviště), zaslepené studii využívající vícefaktorový vnořený design. Studie se skládala z pětičlenného panelu vzorků a každý člen panelu byl připraven tak, že do umělé matrice sputa byl nasprejován kmen MTB divokého typu (WT) a kmen MTB mutanta (MUT). Kmeny WT a MUT byly vyrobeny z plazmidů nesoucích buď divoký typ MTB XDR, nebo mutantní sekvence pro geny, na které se test zaměřuje, zapouzdřené v usmrcené, chemicky fixované *E. coli*.

Členové panelu byli připraveni při ~1xLoD a ~3xLoD s použitím teplot tání (T_m) promotoru *inhA*, který je cílem testu Xpert MTB/XDR, který generuje výsledek **MTB DETECTED/NOT DETECTED** v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti specifické T_m promotoru *inhA* divokého nebo mutantního typu. Testování probíhalo po dobu šesti dnů se třemi šaržemi kazet Xpert MTB/XDR. Na každém pracovišti byli dva operátoři (OP1 a OP2), kteří každý den provedli dvě série se dvěma replikáty/spuštění. Replikace představovala test jedné kazety. Procentuální shoda pro každého člena panelu je uvedena v tabulce 21.

Tabulka 21. Procentuální shoda Xpertu MTB/XDR pro detekci MTB a *inhA*

Ukázka	Místo 1			Místo 2			Místo 3			Celková shoda podle vzorku
	OP 1	OP 2	Mezisoučet	OP 1	OP 2	Mezisoučet	OP 1	OP 2	Mezisoučet	
MTB MUT 1xLoD	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	95.8% (23/24)	97.9% (47/48)	91.7% (22/24)	91.7% (22/24)	91.7% (44/48)	96.5% (139/144)
MTB MUT 3xLoD	95.8% (23/24)	100% (24/24)	97.92% (47/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	99.3% (143/144)
MTB WT 1xLoD	100% (24/24)	91.67% (22/24)	95.8% (46/48)	91.7% (22/24)	91.7% (22/24)	91.7% (44/48)	91.7% (22/24)	100% (24/24)	95.8% (46/48)	94.4% (136/144)
MTB WT 3xLoD	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (144/144)
NEG	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	100% (24/24)	100% (48/48)	100% (24/24)	95.8% (23/24)	97.9% (47/48)	99.3% (143/144)

Výkonnost testu Xpert MTB/XDR u kmenů MTB WT a MUT při nízkém (~1x) a středním (~3x) LoD panelu vzorků pro každý genový cíl, kde byl detekován MTB, je uvedena v tabulce 22.

Tabulka 22. Procentuální shoda Xpert MTB/XDR u vzorků typu MTB MUT a WT

Drogy	Procentuální shoda			
	MTB MUT 1x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB MUT 3x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB WT 1x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB WT 3x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]

Drogy	Procentuální shoda			
	MTB MUT 1x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB MUT 3x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB WT 1x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]	MTB WT 3x LoD (95% CI) [n souhlasí/celkem n]
INH	100.00% (97.3-100) [139/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	89.1% (82.6-93.4) [115/129]	99.3% (96.2-99.9) [143/144]
FLQ	87.80% (81.3-92.2) [122/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	81.4% (73.8-87.2) [105/129]	95.8% (91.2-98.1) [138/144]
ETH	100.00% (97.3-100) [139/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	99.2% (95.7-99.9) [128/129]	100.0% (97.4-100.0) [144/144]
AMK	100.00% (97.3-100) [139/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	91.5% (85.4-95.2) [118/129]	98.6% (95.1-99.6) [142/144]
CAP	99.30% (96.3-99.0) [138/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	98.4% (94.5-99.6) [127/129]	99.3% (96.2-99.9) [143/144]
KAN	100.00% (97.3-100) [139/139]	100.00% (97.4-100.0) [143/143]	91.5% (85.4-95.2) [118/129]	98.6% (95.1-99.6) [142/144]

21 Odkazy

1. KDO. Globální zpráva o tuberkulóze 2019. www.who.int/tb/publications/global_report
2. KDO. 2018, Rychlé sdělení: Klíčové změny v léčbě tuberkulózy rezistentní vůči více lékům a rifampicinu.
3. WHO, 2019, Rychlá komunikace: Klíčové změny v léčbě tuberkulózy rezistentní vůči lékům
4. Sulis G, Pai M (2020) Tuberkulóza rezistentní vůči isoniazidu: Problém, který již nemůžeme ignorovat. PLoS Med 17(1): e1003023
5. Soumitesh Chakravorty, Sandy S. Roh, et al Department of Medicine, New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA Detekce tuberkulózy rezistentní vůči isoniazidu, fluorochinolonu, amikacinu a kanamycinu pomocí automatizovaného multiplexního testu s 10 barvami vhodného pro použití v místě péče J Clin Microbiol Jan 2017 Volume 55 Issue 1.
6. Centra pro kontrolu a prevenci nemocí. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicinských laboratořích). Chosewood, LC a Wilson, DE (eds) (2009). Číslo publikace HHS (CDC) 21-1112.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (dříve National Committee for Clinical Laboratory Standards). Ochrana laboratorních pracovníků před infekcemi získanými při práci; schválený pokyn. Dokument M29 (viz poslední vydání).
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (dříve National Committee for Clinical Laboratory Standards). Laboratorní detekce a identifikace mykobakterií; dokument M48A (viz poslední vydání).
9. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o změně nařízení

(ES) č. 1272/2008 (Úř. věst. EU č. 1272/2008)
prosine 2008 o klasifikaci označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnic 67/548/EHS a 1999/45/ES
(kterým se mění nařízení (ES) č. 1907/2007).

10. Normy bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, Sdělení o nebezpečí, toxické a nebezpečné látky (26. března 2012) (29 C.F.R., bod 1910, pododst. Z.
11. Kent PT, Kubica GP 1985. Public Health Mycobacteriology-A Guide for Level III Laboratory, Centers of Disease Control, Atlanta, Publication no. PB 86-216546
12. Camus JC a kol. 2002. Re-anotace sekvence genomu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967-73.)
13. Zhang et al. 1996. Molekulární základ mimořádné citlivosti *Mycobacterium tuberculosis* na isoniazid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(23):13212-13216.
14. Maruri et al. 2012. Systematický přehled gyrázových mutací spojených s *Mycobacterium tuberculosis* rezistentními vůči fluorochinolonům a návrh systému číslování gyráz. *J Antimicrob Chemother*.
15. Vadwai V, Ajbani K, Jose M, Vineeth VP, Nikam C, Deshmukh M, Shetty A, Soman R, Rodrigues C. Can inhA mutation predict ethionamide resistance? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013 Jan;17(1):129-30. doi: 10.5588/ijtld.12.0511. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23146620
16. Dunn JJ, Starke JR, Revell PA. 2016. Laboratorní diagnostika infekce a onemocnění vyvolaných *Mycobacterium tuberculosis* u dětí. *J Clin Microbiol* 54:1434 -1441. doi:10.1128/JCM.03043
17. Diagnostické standardy a klasifikace tuberkulózy u dospělých a dětí, *Am J Respir Crit Care Med* Vol 161. pp 1376-1395, 2000.
18. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC (2015) Genetické mutace spojené s rezistencí k isoniazidu u *Mycobacterium tuberculosis*: Systematický přehled. *PLoS ONE* 10(3): e0119628. doi:10.1371/journal.pone.0119628
19. Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, Kaur D, Sloutsky A, Mitnick CD, Murray M. 2016. Gyrázové mutace jsou u *Mycobacterium tuberculosis* spojeny s různými úrovněmi rezistence vůči fluorochinolonům. *J Clin Microbiol* 54:727-733. doi:10.1128/JCM.02775-15.
20. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 2007 May;7(5):328-37.
21. Banada, P. et.al. Omezení rizika bioaerosolové infekce pomocí testu Xpert MTB/RIF a jeho použitelnost v zařízeních poskytujících zdravotní péči. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010.48:10. 3551-3557.

22 Sídla společnosti Cepheid

Sídlo společnosti

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089
Spojené státy americké

Telefon: + 1 408 541 4191
Fax: + 1 408 541 4192
www.cepheid.com

Evropské ústředí

Cepheid Europe SAS
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francie

Telefon: + 33 563 825 300
Fax: + 33 563 825 301
www.cepheidinternational.com

23 Technická pomoc

Než nás kontaktujete

Před kontaktováním technické podpory společnosti Cepheid shromážděte následující informace:

- Název produktu
- Číslo šarže

- Sériové číslo přístroje
- Chybová hlášení (pokud existují)
- Verze softwaru a případně číslo servisního štítku počítače

Spojené státy americké

Telefon: +1 888 838 3222 E-mail:
techsupport@cepheid.com

Francie

Telefon: +33 563 825 319 E-mail:
support@cepheideurope.com

Kontaktní informace na všechny pobočky technické podpory společnosti Cepheid jsou k dispozici na našich webových stránkách: www.cepheid.com/en/support/contact-us

24 Tabulka symbolů

Symbol	Význam
	Katalogové číslo
	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>
	Označení CE - evropská shoda
	Nepoužívejte znovu
	Kód dávky
	Přečtěte si návod k použití
	Výrobce
	Obsahuje dostatečné množství pro <i>n</i> testů
	Kontrola
	Datum vypršení platnosti
	Omezení teploty
	Biologická rizika
	Upozornění
	Hořlavé kapaliny
	Koroze kůže
	Toxicita pro reprodukci a orgány

Symbol	Význam
	Země výroby



Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna,
Švédsko



25 Historie revizí

Popis změn: 302-3514 Rev C na Rev D

Sekce	Popis změny
Na stránkách	Změnil případy, kdy se slovo "Assay" používá jako obchodní značka, na "test".
Prohlášení o ochranných známkách, patentech a autorských právech	Aktualizováno podle normy pro technické publikace.
3.1	K určenému použití bylo přidáno "kvalitativní", protože zařízení má kvalitativní funkci.
9.2	Přidány informace o kulturách MGIT.
11.5	Aktualizované zpracování MGIT.
14	Přidány informace týkající se externích ovládacích prvků.
18.1	Aktualizované nadpisy tabulek, které jasně označují retrospektivní a prospektivní údaje, a to výhradně z důvodu lepší čitelnosti nebo přehlednosti. Přidány poznámky pod čarou k tabulkám 5 a 9.
18.2	Přidáno zpracování kultury MGIT před testováním.
22	Aktualizováno podle normy pro technické publikace.
23	Přidáno prohlášení o tom, jak hlásit závažné incidenty. Aktualizováno podle normy pro technické publikace.