

# RESPIRAČNÍ VIRY

(16 JAMEK) REF 20602

Pro systém *HIGH-PLEX 24*

NÁVOD K POUŽITÍ



OZNÁMENÍ ZMĚN: ČERVENEC 2018

**Aktualizovaný test Influenza A:** tento test byl navržen tak, aby se zaměřil na alternativní segment genomu chřipky A, aby se zvýšila citlivost testu byly vyloučeny účinky nedávných mutací v matricovém genu.

**Aktualizovaný test HA-H3:** tento test byl vylepšen, aby se zvýšilo rozlišení od H1 (2009).

**Test hPIV1:** tento test byl přepracován tak, aby umožnil kombinaci s testy hPIV2 a hPIV3. Testy lidského parainfluenza viru (hPIV) 1, 2 a 3 byly zkombinovány do jedné jamky, aby se uvolnil prostor pro detekci dalších cílových patogenů v panelu. Tyto kombinované testy stále umožňují rozlišení jednotlivých podtypů.

**Aktualizace testu Coronavirus:** test 229E zůstává stejný, ale ostatní koronaviry jsou cíleny novými testy. Koronavírové testy byly sloučeny do jedné jamky, aby se uvolnil prostor pro další cílové patogeny v panelu. Kombinovaný koronavirový test amplifikuje lidské  $\alpha$ -koronaviry a  $\beta$ -koronaviry podskupiny A. Kombinovaný koronavirový test **NEROZLIŠUJE** mezi jednotlivými podtypy.

Přidání testu **Human Bocavirus**.

Přidání testu **Parechovirus**, který detekuje typy 1-8.

Přidání testu **EV specify**.



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

# Obsah

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

## 1. VAROVÁNÍ A LIMITACE

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

## 2. DALŠÍ NUTNÉ INSTRUKCE



Tento manuál obsahuje specifické informace o produktu Influenza+ RSV, které nejsou uvedeny v jiných manuálech.

Tento manuál musí být přečten společně s:

- manuálem pro systém *High-Plex 24* (Dokument 9150r10),
- manuálem pro mastermix (Dokument 40000r03)
- manuálem pro syntetické pozitivní kontroly (Dokument 91001r05).

## 3. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Kit **Respiratory Viruses** (respirační viry) (16-jamek) je navržen pro *in vitro* diagnostiku (IVD), provedenou dostatečně proškoleným a zkušeným personálem v kvalifikovaných laboratořích, ve kterých se používá systém *High-Plex 24* (REF 9150).



Tyto testy využívají multiplexovou tandemovou polymerázovou řetězovou reakci (MT-PCR)<sup>1</sup> pro amplifikaci cílové DNA a/nebo RNA. Podrobnější popis principu této metody naleznete v manuálu pro systém *High-Plex 24*.

Kit **Respiratory Viruses** (respirační viry) (16-jamek) je navržen jako poloautomatický IVD test pro identifikaci patogenů v extraktech nukleových kyselin z příslušných typů vzorků. Typy vzorků, které je možno použít, naleznete v kapitole 6.

Seznam patogenů, které lze detekovat pomocí tohoto kitu, naleznete v kapitole 4.

## 4. CÍLOVÉ PATOGENY KITU

Respiratory Viruses (respirační viry) (16-jamek) REF 20602 VER 16

ARTG ID: 235809, CE



<u>Test</u>	<u>Cílový patogen</u>
Influenza A	virus chřipky A (zahrnuje H1, H3, H5 a H7)
H1(2009)	virus chřipky A, sérotyp pdH1N1
HA-H3	virus chřipky A, sérotyp HA (včetně H3N2)
Influenza B	virus chřipky B (větve Yamagata a Victoria)
RSV	Respirační syncytiální virus (zahrnuje a rozlišuje typy A a B)
RV/EV	Rhinovirus (typy A, B, C) a Enterovirus (typy A, B, C, D)
EV	Enterovirus (typy A, B, C, D)
HBoV	lidský Bocavirus 1
hPIV1-3	lidský Parainfluenza virus (detekuje typy 1,2,3)
hPIV4	lidský Parainfluenza virus 4A a 4B
Parechovirus	lidský Parechovirus (zahrnuje typy 1 – 8)
hAdv	lidský Adenovirus (zahrnuje skupiny B, C, E a některé A, D, nezahrnuje hAdv21)
hMPV	lidský Metapneumovirus (zahrnuje všechny typy kmenů A a B)
Coronavirus	lidský Coronavirus (detekuje $\alpha$ -koronaviry a podskupinu A $\beta$ -koronavirů)
Sample Adequacy	lidský referenční gen pro kontrolu správnosti odběru vzorku
SPIKE	umělá sekvence pro kontrolu testu

Tento výrobek je v souladu s regulačními požadavky pro zdravotnické prostředky IVD příslušných úřadů v Austrálii (ARTG 235809) a Evropské unie (CE).

### 4.1 POPIS CÍLOVÝCH PATOGENŮ

**Lidské adenoviry (hAdv)** způsobují infekce horních a dolních cest dýchacích v průběhu celého roku nebo v ohniscích v uzavřených komunitách. Většina lidí měla do věku 10 let nejméně jednu adenovirovou infekci<sup>2</sup>. Nejčastěji jsou s respiračními onemocněními spojovány hAdv kmene B (typy 3 a 7), C (typy 1, 2 a 5) a E (typ 4)<sup>3</sup>. **Test hAdv** je navržen tak, aby detekoval všechny tři kmene s výjimkou typu 21 hAdv kmene B.

**Lidské koronaviry (hCV)** jsou RNA viry, které jsou hned za rhinoviry nejčastější příčinou běžného nachlazení<sup>2</sup>. Čtyři druhy jsou nepřetržitě distribuovány po celém světě: hCV-HKU1, -229E, -OC43 a -NL63<sup>2</sup>. Nejčastěji izolované koronaviry jsou hCV-229E a hCV-OC43<sup>2</sup>. Software MT Analysis NEROZLIŠUJE mezi všemi typy lidských koronavirů.

**Lidské bokaviry (HBoV)** patří mezi parvoviry a byly poprvé izolovány ve Švédsku v roce 2005. HBoV byly nalezeny po celém světě bez specifického geografického nebo sezónního rozdělení<sup>4</sup>. HBoV jsou běžně spojeny s respiračními infekcemi u dětí a méně často u dospělých. Může být nalezen samostatně nebo častěji v kombinaci s jinými viry, o nichž je známo, že způsobují respirační obtíže<sup>5</sup>.

**Chřipkový virus A** je nejvíce virulentní chřipkový virus u lidí a jeho podtypy se rozlišují v závislosti na povrchovém hemagglutininu (HA) a neuraminidáze (NA). Nejvýznamnější podtyp H1 byl H1N1, který způsobil španělskou chřipku v roce 1918<sup>2</sup>. V roce 2009 se objevil nový kmen H1N1 (pdH1N1 nebo "prasečí chřipka"), který obsahoval virové segmenty z lidské, prasečí a ptačí chřipky<sup>6</sup>. Nejběžnější variantou H3 je H3N2, která měla první výskyt v Hongkongu v roce 1968<sup>7</sup>. Hostitelem varianty H5 a H7 jsou ptáci, s určitými kmeny přenosnými na člověka (způsobující "ptačí chřipku"), kde sporadické infekce vyvolávají znepokojení ohledně možného ohrožení veřejného zdraví. **Test viru chřipky A** je určen k detekci podtypů H1, H3, H5 a H7.

Zkouška typizace chřipky (**Flu typing**) je určena k detekci pdH1N1 (prasečí chřipka) a H3 a software MT Analysis mezi pdH1N1 a H3 rozlišuje.

**Chřipkový virus B** je méně častý než chřipka A, ale způsobuje také chřipkové infekce, protože lidská imunita je překonávána mutacemi viru. **Test viru chřipky B** je navržen tak, aby detekoval obě varianty chřipky B, Victoria a Yamagata<sup>8</sup>.

**Lidský metapneumovirus (hMPV)** byl izolován v roce 2001, ale cirkuloval již dříve<sup>2</sup>. hMPV je rozdělen na dvě podskupiny (A a B) a různé linie cirkulují z roku na rok<sup>9</sup>. hMPV vykazuje podobné příznaky jako RSV, nicméně na rozdíl od RSV nebyla dosud prokázána žádná zvláštní podskupina hMPV, která by vedla k závažnějšímu onemocnění než jiné podskupiny<sup>9</sup>. **HMPV test** je určen k detekci hMPV A a B a software MT Analysis mezi těmito dvěma podskupinami rozlišuje.

**Lidské parainfluenza viry (hPIV1, hPIV2, hPIV3 a hPIV4)** jsou rozšířeny po celém světě a způsobují významné respirační infekce u dětí předškolního věku a imunokompromitovaných pacientů<sup>2</sup>. Ze čtyř typů hPIV jsou typy 1 až 3 častěji izolovány při infekcích dýchacích cest<sup>10</sup>. **Testy hPIV** jsou navrženy tak, aby detekovaly příslušné typy (tj. hPIV1 až hPIV4).

**DŮLEŽITÉ:** Test hPIV4 obsahuje kombinaci dvou cílových sekvencí pro stanovení přítomnosti typu hPIV4.

**Lidský Parechovirus (HPeV)** je pikornavirus, který je nejčastěji spojen s infekcí u novorozenců nebo dětí do 10 let věku. Podobně jako EV se obtížně kultivuje a tvoří až 2 % izolátů "EV" v klinických laboratořích při použití buněčné kultury<sup>11</sup>. HPeV1 a HPeV2 jsou nejčastějšími typy HPeV, izolované po celém světě, a HPeV3 je nejčastější příčinou HPeV meningitidy<sup>11</sup>. **Parechovirový test** je určen k detekci typů HPeV 1 - 8.

**Respirační syncytiální virus (RSV)** je nejčastější příčinou infekcí dolních cest dýchacích u malých dětí a představuje 50-90 % hospitalizací u nemocných s bronchiolitidou<sup>2</sup>. Z obou kmenů v oběhu, A a B, je převládající kmen RSV A. **Test RSV** je navržen tak, aby detekoval RSV A i B a software MT Analysis mezi těmito dvěma kmeny rozlišuje.

**DŮLEŽITÉ:** Rozlišení mezi kmeny RSV A a B je pouze informativní.

**Rhinoviry a enteroviry (RV/EV)** jsou členy pikornavirů, které jsou považovány za nejčastější příčinu virových infekcí na celém světě, zejména co se týče "obyčejného nachlazení". EV sérotypy byly zpočátku definovány svou patogenitou buď jako polioviry, coxsackieviry nebo echoviry, avšak byly podle molekulárních rozdílů překlasičkovány jako enteroviry A až J<sup>11</sup>. Rhinoviry (RV) jsou spojeny s vysokou mírou infekcí horních cest dýchacích a nachlazení u dětí a postarších osob<sup>12</sup>. **Test RV/EV** je navržen tak, aby detekoval lidské skupiny rhinovirů A až C a lidské enterovirové skupiny A až D. Zahrnuje dříve používané klasifikační skupiny viru: echoviry; coxsackieviry A a B; a enteroviry 68, 70 a 71. Software pro analýzu **nerozlišuje** rhinoviry (RV) a enteroviry (EV).

**Test EV** je určen k detekci enterovirových skupin A až D, který zahrnuje předchozí klasifikační skupiny viru: echoviry; coxsackieviry A a B; a enteroviry 68, 70 a 71.

## 5. SLOŽKY KITU: MATERIÁL A SKLADOVÁNÍ

Poznámka: Žádné reagensie AusDiagnostics neobsahují nebezpečné látky uvedené v nařízení (ES) č. 1272/2008<sup>13</sup> ani podle klasifikace GHS.

<u>Název kitu</u>	<u>Složky kitu</u>	<u>REF</u>	<u>GTIN</u>
-------------------	--------------------	------------	-------------

Respiratory Viruses

(16 jamek)

- |                                    |          |               |
|------------------------------------|----------|---------------|
| - Step1 Tubes = zkumavky kroku 1   | 20602S   | 9343044001413 |
| - Step 2 Plates = destičky kroku 2 | 20602P   | 9343044001406 |
| - Low RNA Mastermix                | 40330RNA | 9343044001215 |

### 5.1 ZKUMAVKY KROKU 1

Zkumavky kitu Respiratory Viruses (16-jamek) obsahují zkumavky pro 96 vzorků.

Materiál	Štítek	Popis	Funkce	Množství
Zkumavky pro krok 1	<b>STEP 1 TUBES</b>	1×zvlášť balený sáček obsahující 12×8jamkových stripů s vysušenými oligonukleotidy	Nádobka pro multiplexovou PCR kroku 1	96








### INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

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

Expirace produktu je 6 měsíců od data uvedeného na štítku.

## 5.2 DESTIČKY KROKU 2

Obsah této krabičky kitu Respiratory Viruses (16-jamek) postačí pro 288 vzorků.



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



### INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ A MANIPULACI

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

### 5.3 MASTER MIX

Štítek krabičky s Master mixem	Materiál	Značka	Popis	Objem	Množství
LOW RNA MASTER MIX REF 40330DNA	Step 1 Low RNA		0,5ml zkumavka se žlutým víčkem. Obsahuje enzymy v pufru pro reakci kroku 1.	120 µl	10
Nepoužívat opakovaně!!!	Step 2 Low RNA		1,5 ml zkumavka s červeným víčkem. Obsahuje enzymy v pufru pro reakci kroku 2.	1000 µl	10

#### INSTRUKCE PRO SKLADOVÁNÍ PRODUKTU A ZACHÁZENÍ S NÍM



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

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



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

### 5.4 POŽADOVANÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ DODÁVKY

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

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



## 6. POŽADAVKY NA VZORKY

### 6.1 DRUH VZORKŮ A JEJICH OBJEM

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

Přijatelné typy vzorků zahrnují výtěr z nosu a krku, nasofaryngeální výtěr, nasofaryngeální aspirát, tracheální aspirát, bronchoalveolární laváž (BAL), sputum, plicní biopsii, bronchiální laváž, izolát z kultivace a mozkomíšni mok.

Objem vzorku přidaného do zkumavky kroku 1 musí být 10 µl.

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

### 6.2 VHODNÉ METODY EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN

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

Následující manuální a automatizované metody extrakce nukleových kyselin byly ověřeny zákazníky společnosti AusDiagnostics a jsou považovány za vhodné pro produkci extraktů nukleových kyselin kompatibilních s kitem Respiratory Viruses (16 jamek).

Extrakční systém	Typ
bioMerieux, NucliSENS easyMAG	Automatický
Perkin-Elmer Chemagic Prepito-D	Automatický
Qiagen EZ1Advanced	Automatický
Qiagen QIAamp	Manuální
Qiagen QIASymphony	Automatický
Roche High Pure series	Manuální
Roche MagNA Pure	Automatický

## 7. DALŠÍ MOŽNOSTI NASTAVENÍ MT TESTU

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

Pipetování: Tabulka níže vysvětluje možnosti dostupné u robotického pipetování.

Možnosti pipetování	Popis
Manuál pipetting into tube strip	Extrakty nukleových kyselin byly pipetovány manuálně do zkumavek kroku 1 (Step 1) před spuštěním runu. Není tedy vyžadováno robotické pipetování.
Robot sampling from 2 ml tubes	Extrakty nukleových kyselin umístěné v 2ml zkumavkách jsou nanášeny do bloku pro robotické pipetování.
Robot sampling from 1.5 ml flip-cap tubes	Extrakty nukleových kyselin umístěné v 1,5 ml zkumavkách jsou nanášeny do bloku pro robotické pipetování.
Robot sampling from 96 well plate samples 1-24	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 1 - 24.
Robot sampling from 96 well plate samples 25-48	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 25 - 48.
Robot sampling from 96 well plate samples 49-72	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 49 - 72.
Robot sampling from 96 well plate samples 73-96	Extrakty nukleových kyselin, umístěné v 96 jamkové destičce, jsou umístěny do oblasti bloku pro robotické pipetování z jamiček 73 - 96.

## 8. VÝSLEDKY

Amplifikační křivky a křivky teploty tání runu jsou zobrazeny v softwaru MT Analysis. Na základě zadaných parametrů označí software cílovou sekvenci jako **‘Present’** (přítomna), **‘Check’** (je nutná kontrola uživatelem) nebo nezobrazí nic (nedetekováno, políčko zůstane prázdné).

Koncentrace cílové sekvence je spočítána relativně vzhledem k vnitřní kontrole SPIKE, která amplifikuje známé množství cílových molekul.

Nezapomeňte, že jsou možné násobné infekce. V tomto případě lze relativní význam každé cílové sekvence odvodit z normalizovaného procenta (zobrazeného v závorce za "Present").

Všechny změny udělané uživatelem budou jasně označeny v závěrečné zprávě Analysis Report.



Další podrobnosti o analýze výsledků naleznete v manuálu k systému High-Plex 24 (kapitola 11).

## 9. KONTROLY

### 9.1 POZITIVNÍ KONTROLA

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



Syntetické pozitivní kontroly pro respirační patogeny (REF 91011) obsahují všechny cílové sekvence pro kit Respiratory Viruses (16-jamek). Před jejich použitím si přečtěte příložený uživatelský manuál.

### 9.2 NEGATIVNÍ KONTROLA

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

NEPOUŽÍVEJTE PRO ČIŠTĚNÍ NÁSTROJE BĚLIDLO.

### 9.3 KONTROLA LIDSKÉ DNA A SPRÁVNOSTI ODBĚRU VZORKU

Test *Sample Adequacy Control* cílí na lidský referenční gen jako indikátor vhodnosti extraktu nukleové kyseliny nebo přímo druhu vzorku.

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

## 9.4 KONTROLA EXTRAKCE NUKLEOVÉ KYSELINY

Je odpovědností uživatele zajistit, aby byl zaveden vhodný postup extrakce nukleových kyselin. Doporučujeme, aby byla do každého extrakčního běhu zařazena známá pozitivní kontrola. Jako kontrola DNA může být použita syntetická pozitivní kontrola pro respirační patogeny (REF 91011). Pro kontrolu extrakce RNA musí být použit známý pozitivní vzorek RNA. Není-li kontrola extrakce nukleové kyseliny detekována, nemůžeme se spoléhat na negativní výsledky. Doporučujeme, aby byl jakýkoli vzorek s negativní kontrolou extrakce nukleových kyselin znovu odebrán a případně znovu extrahován a analýza byla opakována.

## 9.5 KONTROLA INHIBICE VZORKU A FUNKCE PŘÍSTROJE

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

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

## 10. KLINICKÉ PARAMETRY TESTU

### 10.1 REPRODUKOVATELNOST A OPAKOVATELNOST


**Reprodukovatelnost** testu systému *High-Plex* byla vyhodnocena testováním 10 extraktů nukleových kyselin z klinických vzorků a 11 syntetických pozitivních kontrol pomocí 3 šarží, 3 systémů a 3 operátorů po dobu 3 dnů. Pro každý ze vzorků byl porovnán variační koeficient (CV) pro výsledné průměrné hodnoty Ct. Hodnoty CV v každém vzorku byly pod 7 %.

**Opakovatelnost** testu systému *High-Plex* byla vyhodnocena testováním 10 extraktů nukleových kyselin z klinických vzorků a 11 syntetických pozitivních kontrol na jednom systému *High-Plex*. Pro každý ze vzorků byl porovnán variační koeficient (CV) pro výsledné průměrné hodnoty Ct. Hodnoty CV v každém vzorku byly pod 7 %.

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

### 10.2 INTERFERUJÍCÍ ČINIDLA

Testovali jsme řadu exogenních a endogenních látek na potenciální rušení PCR. V důsledku přítomnosti kterékoli testované látky nebyla pozorována žádná nebo jen minimální interference. Při použití látek s vysokými koncentracemi ethanolu bylo pozorováno určité rušení u RNA master mixu. Promývací pufr na bázi ethanolu používané při extrakci nukleových kyselin se nesmí přenést do PCR. Přítomnost interní kontroly SPIKE ve všech produktech AusDiagnostics kontroluje v každém vzorku možné rušení PCR.

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

### 10.3 ANALYTICKÁ SPECIFICITA

Patogeny, které jsou pravděpodobně přítomny ve vzorcích používaných během klinické validace, byly testovány na zkříženou reaktivitu s testy v tomto produktu. Nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita mezi organismy běžně nalézány v respiračním traktu<sup>14</sup>.

### 10.4 ANALYTICKÁ SENSITIVITA

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

Test	LoD (kopie/µl)	LoD (kopie/ml)
Influenza A	76-95	1,900-2,375
HA-H3	18-35	450-875
H1(2009)	18	450
Influenza B	21	525
RSV B	85	2125
RSV A	4-27	50 - 675
RV/EV	41	1,025
EV	3	75
HBoV	probíhá	probíhá
hPIV1	7-18	175 - 450
hPIV2	100	2,500
hPIV3	18-37	450 - 925
hPIV4	2-19	50-475
Parechovirus	4-40	100-1,000
hAdv	43	1075
hMPV (hMPV B)	13-25	325 - 625
hMPV (hMPV A)	4	100
hCV 229E	54	1,350
pan-Coronavirus	84-167	2,100-4,175

## 10.5 KLINICKÁ ÚČINNOST

Klinická účinnost pro cílové sekvence používané v tomto kitu byla hodnocena v mnoha klinických laboratořích v Austrálii, na Novém Zélandu a ve Spojeném království. Alternativní metoda každé instituce byla považována za referenční metodu pro toto hodnocení.

<b>Test</b>	<b>SENSITIVITA % (95% interval spolehlivosti)</b>	<b>SPECIFICITA % (95% interval spolehlivosti)</b>
Influenza A	100.0 (92.3-100.0)	100.0 (97.8-100.0)
HA-H3	100.0 (78.0-100.0)	100.0 (96.6-100.0)
H1(2009)	100.0 (86.7-100.0)	100.0 (98.6-100.0)
Influenza B	100.0 (92.7-100.0)	99.9 (99.4-100.0)
RSV	100.0 (96.8-100.0)	99.7 (98.9-99.9)
RV/EV	98.9 (93.2-99.9)	96.5 (93.6-98.1)
EV	84.4 (74.2-94.4)	98.5 (97.5-99.6)
HBoV	83.7 (68.7-92.7)	99.3 (97.3-99.9)
hPIV1	100.0 (86.3-100.0)	98.8 (96.3-99.7)
hPIV2*	100.0 (67.9-100.0)	99.8 (98.9-100.0)
hPIV3	96.4 (79.8-99.8)	100.0 (99.2-100.0)
hPIV4*	100.0 (51.7-100.0)	100.0 (98.7-100.0)
Parechovirus	89.7 (74.8-96.2)	99.3 (97.9-99.8)
hAdv	100.0 (91.9-100.0)	99.8 (98.6-100.0)
hMPV	100.0 (90.2-100.0)	99.6 (98.7-99.9)
pan-Coronavirus	86.6 (74.6-95.7)	100.0 (98.6-100.0)

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

## 11. KONTAKT A SERVIS

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

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

Mgr. Jiří Smutný










Tel.: +420 601 394 077

Email: [smutny@biovendor.cz](mailto:smutny@biovendor.cz), [www.biovendor.cz](http://www.biovendor.cz)

BioVendor - Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

## 12. SLOVNÍČEK SYMBOLŮ

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



### 13. REFERENCE

1. Stanley, K.K. & Szewczuk. E. (2005) Multiplexed tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection. *Nucleic Acids Research*. 33: e180.
2. Public Health England (2014) *Respiratory Viruses* (SMI G 8). Accessed October 2015 from: [https:// www.gov.uk/government/publications/smi-g-8-respiratory-viruses](https://www.gov.uk/government/publications/smi-g-8-respiratory-viruses)
3. Centers for Disease Control and Prevention (2015) *Adenoviruses*. Retrieved 6 August 2015 from: [http:// www.cdc.gov/adenovirus/index.html](http://www.cdc.gov/adenovirus/index.html)
4. Guido, M., *et al.* (2016) Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 22(30), 8684-8697.
5. Vaughn, D.W., A. Barrett, and T. Solomon. 2010. Flaviviruses. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th edn, G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R.Dolin (eds). Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA:2133-2156.
6. Bishop, J.F., *et al.* (2009) Australia's winter with the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *New Eng. J. Med.*, 361(27), 2591-4.
7. Bean, W.J., *et al.* (1992) Evolution of the H3 Influenza Virus Hemagglutinin from Human and Nonhuman hosts. *J. Virol.*, 66(2), 1129 - 1138.
8. Rota, P.A., *et al.* (1990) Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*, 175(1), 59-68.
9. Sloots, T.P., *et al.* (2006) Human Metapneumovirus, Australia, 2001-2004. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(8), 1263-6.
10. Liu, W., *et al.* (2013) Epidemiology and the clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infect. Dis.*, 13(28), doi:10.1186/1471-2334-13-28.
11. Scheld, M.W., *et al.* (2014) *Infections of the central nervous system* (4th Ed.). Philadelphia: Wolters KluwerHealth.
12. Mackay, I. (2008) Human rhinoviruses: The cold wars resume. *J. Clin. Virol.*, 42(1), 297-320.
13. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Available from <http://eur-lex.europa.eu>
14. Anderson, T.P. *et al.* (2013) Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens. *Journal of Virological Methods*, 191(2):118–21.

### 14. PUBLIKACE

- Rapid semi-automated quantitative multiplex tandem PCR (MT-PCR) assays for the differential diagnosis of influenza-like illness. Elektra Szewczuk, Kiran Thapa, Terry Anninos, Kenneth McPhie, Geoff Higgins, Dominic E Dwyer, Keith K Stanley and Jonathan R Iredell. *BMC Infectious Diseases*, 2010, 10:113.
- Outbreaks of Pandemic (H1N1) 2009 and Seasonal Influenza A (H3N2) On Cruise Ship. Kate A. Ward, Paul Armstrong, Jeremy M. McAnulty, Jenna M. Iwasenko, and Dominic E. Dwyer. *Emerging Infectious Diseases*. 2010, 16(11):1731-7.
- Comparison of adult patients hospitalised with pandemic (H1N1) 2009 influenza and seasonal influenza during the “PROTECT” phase of the pandemic response. Ya-Shu Chang, Sebastiaan J van Hal, Peter M Spencer, Iain B Gosbell and Peter W Collett. *Medical Journal of Australia*. 2010, 192(2):

90-3.

- Enhanced Diagnosis of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Infection Using Molecular and Serological Testing in Intensive Care Unit Patients with Suspected Influenza. Jenna M. Iwasenko, Michelle Cretikos, David L. Paterson, Robert Gibb, Steven A. Webb, David W. Smith, Christopher C. Blyth, Dominic E. Dwyer, Jane Q. Shi, Peter Robertson, and William D. Rawlinson. *Clinical Infectious Diseases* 2010, 51(1): 70–2.
- Comparison of a Rapid Antigen Test with Nucleic Acid Testing during Cocirculation of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 and Seasonal Influenza A/H3N2. Jen Kok, Chris C. Blyth, Hong Foo, Jason Patterson, Janette Taylor, Kenneth McPhie, V. Mala Ratnamohan, Jonathan R. Iredell, and Dominic E. Dwyer. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(1):290–1
- Influenza A testing and detection in patients admitted through emergency departments in Sydney during winter 2009: implications for rational testing. Andrew Jardine, Stephen J Conaty, Michelle A Cretikos, Wei-Yuen Su, Iain B Gosbell and Sebastiaan J van Hal. *Medical Journal of Australia* 2010, 193(8): 455–9.
- Thermal Image Scanning for Influenza Border Screening: Results of an Airport Screening Study. Patricia C. Priest, Alasdair R. Duncan, Lance C. Jennings, Michael G. Baker. *PLoS One*. 2011, 6(1):e14490.
- The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. Christopher C. Blyth, Steve A. R. Webb, Jen Kok, Dominic E. Dwyer, Sebastiaan, J. van Hal, Hong Foo, Andrew N. Ginn, Alison M. Kesson, Ian Seppelt, Jonathan R. Iredell, on behalf of the ANZIC Influenza Investigators and COSI Microbiological Investigators. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2013, 7(2):168–76.
- Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens. Trevor P. Anderson, Anja M. Werno, Kevin Barratt, Patalee Mahagamasekera, David R. Murdoch, Lance C. Jennings. *Journal of Virological Methods* 2013, 191(2):118–21.