

SMLOUVA O SPOLUPRÁCI

GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119

619 00 Brno

IČ: 26981947

DIČ: CZ26981947

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 4415

Zastoupena: [redacted] předsedou představenstva

(dále jen „GeneProof“ nebo „zadavatel“)

a

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

IČ: 71009396

DIČ: CZ71009396

Poskytovatel zdravotních služeb

státní příspěvková organizace, nezapisovaná do veřejného rejstříku

Zastoupena: Ing. Eduardem Ježem, ředitelem

(dále jen „ZÚ Ostrava“)

Zdravotni ustav se sidlem

16.09.2019

ZU/29278/2019

listy: 1 přílohy:



zuso0es743b7099

Klinické pracoviště:

Oddělení molekulární biologie

Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

(dále jen „Klinické pracoviště“)

dále společně také jako „smluvní strany“

shora uvedené smluvní strany tímto uzavřely níže uvedeného dne, měsíce a roku, ve smyslu ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník, tuto smlouvu o spolupráci, jako smlouvu nepojmenovanou, (dále jen jako „Smlouva“ či „Smlouva o spolupráci“):

I.

Předmět a účel smlouvy

- GeneProof v souladu se zákonem č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích a o změně zákona č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů, má zájem jako zadavatel v ZÚ Ostrava realizovat hodnocení funkční způsobilosti zdravotnických prostředků in vitro, jejichž bližší specifikace je uvedena v přílohách č. 1, č. 3, č. 5 a č. 7 této smlouvy. K realizaci hodnocení funkční způsobilosti, tedy pro účely výzkumu bude v návaznosti na § 81 odst. 4 zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování (zákon o zdravotních službách) využit biologický materiál (druhově vymezený ve shora uvedených přílohách) odebraný pacientům ZÚ Ostrava při poskytování zdravotní péče, a to tak, aby v souvislosti s jeho používáním pro účely výzkumu, nebyly uvedeny takové údaje, podle nichž by bylo možné identifikovat konkrétního pacienta. Zadavatel v této souvislosti pro odstranění všech pochybností výslovně prohlašuje, že k realizaci hodnocení funkční způsobilosti nebude biologický materiál využit pro výzkum v oblasti genetiky.

2. Předmětem Smlouvy je spolupráce smluvních stran při provádění klinické validace za účelem stanovení klinické způsobilosti GeneProof PCR kitů (dále jen „předmětná klinická validace“ nebo „klinická validace“).
3. Účelem této Smlouvy je stanovit podmínky pro provádění a průběh klinické validace a vymezit práva a povinnosti smluvních stran.

II. Místo a lhůty

1. Sběr klinického materiálu (vzorků) bude probíhat na smluvním klinickém pracovišti.
2. Klinické pracoviště provede vyhodnocení výsledků testování vzorků CE IVD diagnostiky používanými na klinickém pracovišti a také příslušnými GeneProof diagnostiky a následně jejich zpracování do dokumentu „Protokol pro záznam výsledků – Results record“ (Příloha č.2, č.4, č.6, č.8 Smlouvy), které jsou součástí klinické validace.
3. Společnost GeneProof provede celkové vyhodnocení dat klinické validace (diagnostické senzitivity a specifity, pozitivních a negativních prediktivních hodnot, pozitivního a negativního věrohodnostního poměru) na základě vyhodnocení a porovnání výsledků testování CE IVD diagnostiky a diagnostiky GeneProof. Hodnocení funkční způsobilosti bude probíhat po dobu 3 měsíců od data podpisu smlouvy.

III. Základní podmínky provádění klinické validace

1. Klinické pracoviště se zavazuje provádět sběr vzorků dle Designu klinické validace pro konkrétní patogen uvedený v jednotlivých přílohách této Smlouvy.
2. Klinické pracoviště prohlašuje, že jejich laboratoře mají dostatečně kvalifikovaný personál a technické podmínky, které plně zajistí odpovídající kvalitu práce a provádění touto Smlouvou stanoveného sběru vzorků a jejich testování CE IVD diagnostiky a splňují podmínky vyžadované příslušnými právními předpisy.
3. GeneProof se pro účely jednotlivých klinických validací uvedených v přílohách této Smlouvy zavazuje zdarma poskytnout nezbytný spotřební materiál a vybavení nutné pro sběr a uchování vzorků.
4. Obě strany souhlasí s tím, že výsledky testování mohou sloužit jako podklad pro GeneProof Performance Evaluation Report či mohou být kteroukoliv smluvní stranou prezentovány na odborné konferenci, příp. mohou sloužit jako podklady pro publikaci v odborném časopise. Každá taková publikace musí být před publikováním schválena společností GeneProof.
5. Smluvní strany odpovídají za případné škody způsobené porušením povinností plynoucích z této Smlouvy v souladu s platnými právními předpisy.
6. Součástí klinické validace bude vyhodnocení výsledků a stanovení parametrů produktů společnosti GeneProof podle Designu klinických validací vedených v přílohách této Smlouvy (Přílohy č.1, č.3, č.5, č.7). Výsledky této klinické validace budou výlučným majetkem společnosti GeneProof a jejich zveřejnění bude možné pouze po předchozím písemném souhlasu společnosti GeneProof.
7. Smluvní strany se zavazují vzájemně si poskytovat veškeré informace, které by mohly ovlivnit průběh sběru a dalšího testování vzorků.
8. V případě zjištění závažných skutečností, které by měly nebo mohly mít vliv na průběh klinické validace nebo na nemožnost realizace cílů validace, se zavazují smluvní strany vzájemně o těchto skutečnostech informovat a posoudit další pokračování validace.

9. GeneProof si vyhrazuje právo rozhodnout o pokračování klinické validace po posouzení výsledků kontrolních bodů. Kontrolní body jsou specifikovány v Designu klinických validací vedených jako Přílohy č. 1, č.3, č.5, č.7 této Smlouvy.
10. Osoby odpovědné za provedení sběru, testování vzorků a koordinaci činností plynoucích z této Smlouvy jsou:
 - za Klinické pracoviště: [REDACTED]
 - za GeneProof: [REDACTED]
12. GeneProof jako zadavatel se zavazuje na svůj náklad plně dodržovat veškeré povinnosti, které jsou mu v souvislosti s realizací hodnocení funkční způsobilosti zdravotnického prostředku uloženy obecně závaznými právními předpisy, zejména zákonem č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích, rozhodnutím či pokynem příslušného kompetentního orgánu. GeneProof nese výlučnou odpovědnost za případné porušení těchto povinností, pokud porušení povinností není přičitatelné jiné osobě, za kterou GeneProof neodpovídá. Výsledky hodnocení funkční způsobilosti budou uchovávány po dobu 10 let v souladu s interními pravidly pro uchování dokumentů společnosti GeneProof.

IV.

Ochrana důvěrných informací

1. Smluvní strany se zavazují dodržovat mlčenlivost o všech skutečnostech a informacích, které zjistí nebo jim budou poskytnuty v souvislosti s činností prováděnou na základě této Smlouvy.
2. Smluvní strany se zavazují zajistit ochranu osobních údajů o pacientech, které případně získají v rámci validace a v souvislosti s touto Smlouvou. Ochrana osobní údajů bude zajištěna anonymizací vzorků Klinickým pracovištěm tak, aby společnost GeneProof neměla přístup k osobním údajům o pacientech. Společnost GeneProof tedy nebude zpracovávat osobní údaje o pacientech.
3. Důvěrnými informacemi se pro účely této Smlouvy rozumí veškeré výsledky laboratorních testů, zkoušek a prací provedených v rámci provádění validace. Důvěrnými informacemi se pro účely této Smlouvy také rozumí veškeré informace vztahující se k prováděným činnostem. Důvěrné informace zahrnují zejména informace o vzorcích, "know-how", technických postupech a procesech, jakož i jiné informace smluvními stranami označené jako důvěrné. Důvěrné informace budou smluvními stranami drženy v tajnosti vyjma případů, kdy smluvní strana prokáže, že se jedná o informace veřejně přístupné, a dále případů kdy se jedná o jejich použití při přednáškové nebo publikační činnosti za podmínek čl. III. odst. 4 a 7, případně kdy je dána povinnost jejich poskytnutí na základě obecně závazného právního předpisu, rozhodnutí či jiného obdobného pokynu příslušného kompetentního orgánu.
4. Výsledky testování vyjma případů, kdy smluvní strana prokáže, že se jedná o informace veřejně přístupné, mohou být smluvními stranami zveřejněny a používány toliko za podmínky, že nebudou vyraženy či ohroženy osobní údaje pacientů a v souladu s touto Smlouvou nebo na základě vzájemné dohody smluvních stran.
5. Veškeré změny v rámci re-designu validace musí být odsouhlaseny všemi smluvními stranami a zdokumentovány v písemné podobě.

V.

Cena a platební podmínky

1. GeneProof se zavazuje ZU Ostrava uhradit cenu 500 Kč bez DPH za každý vyšetřený vzorek. Celkový počet vyšetřených vzorků je stanoven v Designu klinických validací vedených v přílohách této Smlouvy (Přílohy č.1, č.3, č.5, č.7). Částka bude uhrazena na základě faktury (daňového

dokladu) vystavené ZU Ostrava ihned po poskytnutí protokolů s výsledky. Splatnost faktury činí 30 dnů ode dne jejího vystavení.

2. Úhrada bude prováděna v české měně. V případě prodlení s úhradou faktury, je GeneProof povinen hradit ZU Ostrava zákonný úrok z prodlení.
3. Po ukončení klinické validace veškeré hmotné vybavení a spotřební materiál zůstává majetkem klinického pracoviště.

VI.

Ostatní a závěrečná ujednání

- 1) Na práva a povinnosti touto Smlouvou blíže neupravené se přiměřeně použijí ustanovení českých právních předpisů, zejména zákona č. 89/2012 Sb., občanský zákoník a zákona č. 268/2014 Sb., o zdravotnických prostředcích.
- 2) GeneProof dále souhlasí, a je srozuměn se skutečností, že ZU Ostrava může být na základě zákona č. 106/1999 Sb., o svobodném přístupu k informacím, ve znění pozdějších předpisů a zákona č. 340/2015 Sb., o registru smluv povinen uveřejnit tuto smlouvu v registru smluv nebo o této smlouvě a právním vztahu jí založeném zpřístupnit, či poskytnout všechny informace, které citované zákony nebo jiné právní předpisy z uveřejnění nebo zpřístupnění nevylučují.
- 3) Tato smlouva se uzavírá na dobu určitou, a to 3 měsíců od data účinnosti této smlouvy.
- 4) Od této smlouvy může kterákoliv smluvní strana odstoupit pro závažné porušení povinnosti druhé smluvní strany a vyplývající z této smlouvy. Za závažné porušení povinností se považuje
 - a) na straně GeneProof např.:
 - neposkytnutí nezbytné součinnosti při realizaci předmětu smlouvy,
 - použití biologického materiálu pro výzkum v oblasti genetiky.
 - nedodání nezbytného spotřebního materiálu a vybavení nutného pro sběr a uchování vzorků ani po marné výzvě ZU Ostrava,
 - b) na straně ZU Ostrava např.:
 - neposkytnutí nezbytné součinnosti při realizaci předmětu smlouvy,
 - ztráta odborné způsobilosti nebo způsobilosti pro poskytování zdravotních služeb.Účinky odstoupení od smlouvy nastávají dnem doručení písemného oznámení druhé smluvní straně. Odstoupením se smlouva nezrušuje od počátku, ale až od okamžiku doručení tohoto oznámení druhé smluvní straně. Při absenci průkazu o doručení se má za to, že odstoupení bylo doručeno třetího dne po jeho odeslání poštou.
- 5) Smluvní strany se dohodly, že v případě soudního sporu, vyplývajícího z této Smlouvy, budou postupovat podle českého právního řádu, a příslušné k rozhodování sporů jsou soudy České republiky. Místní příslušnost soudu se určuje dle sídla ZU Ostrava.
- 6) Je-li nebo stane-li se některé ustanovení této Smlouvy neplatným, nedotýká se to ostatních ustanovení této Smlouvy, která zůstávají nadále platná a účinná. Pro vzniklou mezeru se použije ustanovení obecně platných právních předpisů v aktuálním znění nejlépe odpovídající smyslu a účelu Smlouvy.
- 7) Jakékoli změny Smlouvy mohou být provedeny pouze písemně, formou číslovaných dodatků ke Smlouvě a musí být podepsané oprávněnými zástupci smluvních stran.
- 8) Tato Smlouva je vyhotovena ve dvou stejnopisech, z nichž každá smluvní strana obdrží jeden výtisk.
- 9) Tato Smlouva nabývá platnosti dnem podpisu oběma smluvními stranami a účinnosti dnem uveřejnění v registru smluv.
- 10) Nedílnou součástí této Smlouvy je:

Příloha č. 1 – Design klinické validace Legionella pneumophila

Příloha č. 2 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Legionella pneumophila

Příloha č. 3 – Design klinické validace Bordetella pertussis/parapertussis

Příloha č. 4 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Bordetella pertussis/parapertussis

Příloha č. 5 – Design klinické validace Mycoplasma pneumoniae

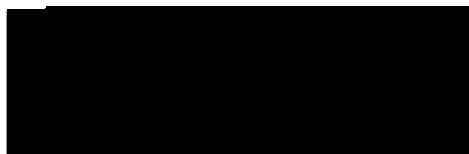
Příloha č. 6 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Mycoplasma pneumoniae

Příloha č. 7 – Design klinické validace Enterovirus

Příloha č. 8 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Enterovirus

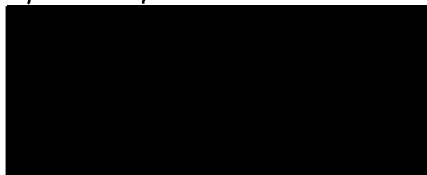
- 11) Smluvní strany prohlašují, že Smlouva byla sepsána při plném vědomí na základě pravdivých údajů, jejich pravé a svobodné vůle, a že nebyla ujednána v tísní ani za jinak jednostranně nevýhodných podmínek, že souhlasí s jejím obsahem a jsou si vědomy všech právních následků ze Smlouvy vyplývajících. Na důkaz toho připojují své podpisy.

V Brně, dne 9.9.2019



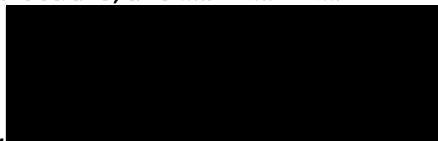
za společnost GeneProof a.s.


předseda představenstva



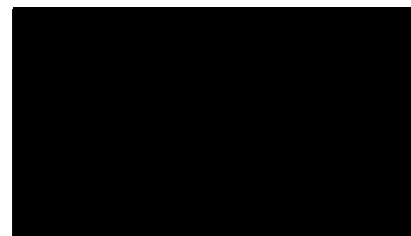
16.09.2019

V Ostravě, dne



za Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Ing. Eduard Ježo
ředitel



Příloha č. 1

Design klinické validace Legionella pneumophila

**Validace za účelem stanovení klinické způsobilosti
GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit**

Zadavatel a sponzor validace:

GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119

619 00 Brno

IČ: 26981947

DIČ: CZ26981947

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 4415

Zastoupena: [REDACTED] CEO, předsedou představenstva

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Zkoušející:

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

IČ: 71009396

DIČ: CZ71009396

Státní příspěvková organizace nezapsaná ve veřejném rejstříku

Zastoupena: Ing. Eduardem Ježem, ředitelem

(dále jen „ZÚ Ostrava“)

Klinické pracoviště:

Oddělení molekulární biologie

Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

(dále jen „Klinické pracoviště“)

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Klinické pozadí

Onemocnění člověka je dosud spojeno jen 15 druhů legionel, nejvíce infekcí bylo dosud způsobeno jen jednou z mnoha sérologických skupin, *Legionella pneumophila* sérotyp 1. Legionelová infekce se rozvíjí po inhalaci aerosolu. Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách: legionářská nemoc (legionelóza), kdy je přítomná pneumonie nebo pontiacká horečka, která probíhá jako chřipkové onemocnění bez pneumonie. Legionelóza se může vyskytovat jako nozokomiální nákaza, zvláště je nutné na ni myslet u pacientů s transplantovanou ledvinou nebo u pacientů s insuficiencí ledvin (legionely mají afinitu k ledvinám), u pacientů imunosuprimovaných a u pacientů po radioterapii. Nejčastěji vyskytuje ve starší věkové populaci. Legionelóza se může vyskytnout i jako komunitní onemocnění u imunosuprimovaných pacientů, lidí pracujících např. ve vodárenském průmyslu aj. Legionelóza se léčí antibiotiky. Osoby v dobré kondici se však mohou uzdravit i bez nich. V Evropě je průměrná úmrtnost na legionelózu 12 %. Úspěšnost léčby roste s včasným odhalením nemoci.

Cíl klinické validace

Validace bude prováděna za účelem stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* na základě porovnání s jiným zavedeným CE IVD diagnostikem. Mezi parametry klinické způsobilosti patří diagnostická senzitivita a specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr. V rámci této validace budou získána data klinické způsobilosti *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* vůči výsledkům vyšetření provedeným pomocí PCR kitu *FTD Legionella (FastTrack)*.

Design validace

Stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit*

- Klinická validace bude prováděna jako retrospektivní na „left-over“ vzorcích od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky.
- Vzorky byly vyšetřeny *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* (GeneProof) určeným pro detekci *Legionella pneumophila*, a to v kombinaci s validovanou izolací *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagene). Pro vyšetření metodou PCR byl použit *Rotorgene 3000* (Qiagene).
- Izoláty vzorků byly po zpracování a vyšetření pomocí *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* (GeneProof) uskladněny na smluvním klinickém pracovišti za podmínek běžných pro skladování tohoto typu klinického materiálu pro vyšetření metodou PCR.
- Následně bude provedeno vyšetření izolátů vzorků pomocí PCR kitu *FTD Legionella (FastTrack)*. Pro vyšetření metodou PCR bude použit *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad).
- V rámci klinické validace bude vyšetřeno až 30 vzorků sputa, až 5 vzorků broncho-alveolární laváže, až 5 vzorků aspirátu a až 5 vzorků punktátu pozitivních na *Legionella pneumophila*. Dále až 30 vzorků

sputa, až 10 vzorků broncho-alveolární laváže, až 10 vzorků aspirátu a až 10 vzorků punktátu negativních na přítomnost *Legionella pneumophila*.

- V rámci klinické validace jsou stanoveny kontrolní body následovně:
 - 1) V rámci klinické validace bude vyšetřeno 30 vzorků sputa, 5 vzorků broncho-alveolární laváže, 1 vzorek aspirátu a 2 vzorky punktátu pozitivních na *Legionella pneumophila* a 30 vzorků sputa, 10 vzorků broncho-alveolární laváže, 10 vzorků aspirátu a 10 vzorků punktátu negativních na přítomnost *Legionella pneumophila* oběma diagnostiky, tedy *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* (GeneProof) a *FTD Legionella* (FastTrack) bude takto definovaný soubor výsledků předán společnosti GeneProof (zadavatel validace) ve formě vyplněného Protokolu pro záznam výsledků-Results record *Legionella pneumophila* (Příloha č.2 Smlouvy).
 - 2) Po zpracování první kolekce vzorků ve společnosti GeneProof bude rozhodnuto v pokračování sběru a testování negativních/positivních klinických materiálů a případnému rozšíření počtu pozitivních/negativních vzorků.

Specifikace a technická dokumentace

Klinický materiál

Ke klinické validaci budou použity „left-over“ vzorky sputa, broncho-alveolární laváže, aspirátu a punktátu od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky.

Specifikace *FTD Legionella* (FastTrack)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

FTD *Legionella* is an in vitro test for the qualitative detection of bacterial nucleic-acid from throat/nasal swabs, bronchoalveolar lavage, and sputum of human origin and cultures as an aid in the evaluation of infections caused by *Legionella pneumophila* and by *Legionella longbeachae*

Specifikace *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* (GeneProof)

PCR Kit je určen pro detekci *Legionella pneumophila* metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR).

Detekce *L. pneumophila* je založena na principu amplifikace genu kódujícího 16S rRNA specifického pro *L. pneumophila* a na měření nárůstu fluorescence. Přítomnost *L. pneumophila* je indikována nárůstem fluorescence fluoroforu FAM. V reakční směsi je zabudován Interní Standard (IS) kontrolující možnou inhibici PCR (verze ISIN), nebo je dodáván samostatně a kontroluje i kvalitu izolace DNA (verze ISEX). Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální citlivost. Ready to Use MasterMix obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) eliminující možnou kontaminaci PCR amplifikačními produkty. Kit je určen pro *in vitro* diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

Specifikace QIAamp® DNA Mini kit (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

QIAcube is a robotic automated machine for automated purification of DNA, RNA and proteins using the conventional Qiagen spin-column kits.

Specifikace Rotorgene 3000 (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The Rotor-Gene multi-filter system can detect all available real-time chemistries including Sybr-Green, dual-labelled and MGB probes, FRET and Molecular Beacons.

The Rotor-Gene can detect product at high sensitivity without the need for specialised reaction vessels (ie: optical clear caps or glass capillaries). Each unit also provides the flexibility of an interchangeable rotor system to allow for the throughput needs of the day. Provided standard are a 36 well rotor (0.2ml thin walled reaction vessels) and 72 well high throughput rotor (0.1ml strip tubes). The rotors can be interchanged for easy transition from moderate to high throughput applications.

Specifikace CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The CFX96 Touch System is a powerful, precise, and flexible real-time PCR detection system. This six-channel (five colors and one FRET channel) real-time PCR instrument combines advanced optical technology with precise temperature control to deliver sensitive, reliable detection for singleplex or multiplex reactions.

Quickly set up runs and monitor amplification traces in real time on the integrated LCD touch screen, or use the included CFX Maestro Software to easily and intuitively design your experiment and analyze results from a connected computer. With up to five-target detection, unsurpassed thermal cycler performance, unrivaled stand-alone functionality, and powerful yet easy-to-use software, the CFX96 Touch System is designed to advance your qPCR.

Benefity a analýza rizik

- Získání dat potvrzujících klinickou relevanci použití *GeneProof Legionella pneumophila PCR Kit* (GeneProof) v rámci detekce tohoto patogenu ze sputa, aspirátu, broncho-alveolární laváže a punktátu, jakožto standardních klinických materiálů pro tento typ detekce.
- Klinický důkaz potvrzující vysokou úroveň bezpečnosti a funkční způsobilosti, která je v souladu s obecnými požadavky na bezpečnost a funkční způsobilost.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o observační typ validace s využitím pouze mražených „left-over“ vzorků od anonymních pacientů, nehrozí žádná rizika směrem k pacientovi. Získaná data budou použita pouze k účelům srovnání obou diagnostik.

Statistické zpracování dat

Na základě získaných dat bude vypracována 2x2 kontingenční tabulka, která bude sloužit jako podklad pro výpočet dříve definovaných parametrů. Výsledky testů budou zapisovány do samostatného dokumentu, který bude sloužit jako podklad pro statistické zpracování. Dokument bude veden jako Příloha č. 2 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Legionella pneumophila.

Příloha č. 3

**Design klinické validace Bordetella
pertussis/parapertussis**

**Validace za účelem stanovení klinické způsobilosti
*GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit***

Zadavatel a sponzor validace:

GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119

619 00 Brno

IČ: 26981947

DIČ: CZ26981947

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 4415

Zastoupena: [REDACTED] CEO, předsedou představenstva

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Zkoušející:

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

IČ: 71009396

DIČ: CZ71009396

Státní příspěvková organizace nezapsaná ve veřejném rejstříku

Zastoupena: Ing. Eduardem Ježem, ředitelem

(dále jen „ZÚ Ostrava“)

Klinické pracoviště:

Oddělení molekulární biologie

Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

(dále jen „Klinické pracoviště“)

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Klinické pozadí

Pertuse (černý kašel, dávivý kašel) je onemocnění způsobené bakterií *Bordetella*. Jedná se o vysoce nakažlivé, akutní infekční onemocnění. Typická forma pertuse má několik stádií: inkubační, katarální, paroxysmální a rekonvalescenční. Černý kašel se přenáší kapénkovou infekcí, tedy při bližším kontaktu s nemocným. Vnímavý jedinec je ten, který nemá ochranné protilátky po prodělaném onemocnění nebo po očkování. Ani postvakcinační ani postinfekční imunita není u pertuse trvalá. K vyvanutí imunity dochází již 6.–12. rokem po očkování, po prodělaném onemocnění je delší. Dospělý člověk prodělá mírnou formu pertuse průměrně 2,2× za život. Nejnebezpečnější je onemocnění neimunních kojenců, u nichž může mít fatální průběh; transplacentárně přenesené protilátky do 2 měsíců věku vymizí. Inkubační doba pertuse je obvykle 1–3 týdny. K vylučování bordetel dochází už na konci inkubační doby a trvá po celé období kašle, často i v rekonvalescenci. Nejvíce infekční je pacient v katarálním stadiu a v prvních 2 týdnech od začátku kašle. Neimunní kojenec může vylučovat bordetely i 6 týdnů. Černý kašel se vyskytuje celosvětově, více případů je hlášeno v rozvojových zemích. Ročně onemocní 30-50 milionů osob. Onemocnění je nebezpečné především pro malé děti do 1 roku, u kterých může dojít k rozvoji zánětu plic nebo k zástavě dechu. Děti jsou očkovány proti černému kašli v rámci pravidelného očkování, ochrana je však dočasná.

B. parapertussis je původce parapertuse (syndrom dávivého kašle). Onemocnění se velice podobá pertussi, rozdíl je především v délce trvání kašle, která je u parapertuse 31 ± 18 dní, zatímco u pertuse je to 23 ± 11 dní. Cestou přenosu jsou kapénky infikovaného aerosolu, inkubační doba je 7–10 dní, onemocnění následně probíhá ve třech stádiích (katarální, paroxysmální a rekonvalescentní). Bordetelly přilnou na řasinkový epitel dýchacích cest, zde se množí, znemožňují funkci řasinek a poškozují sliznici. Nemocnost parapertusí nevykazuje za posledních deset let velké výkyvy. V roce 2016 bylo registrováno 58 případů onemocnění parapertuse, nemocnost 0,55/100 000 obyvatel.

V terapii jsou lékem volby makrolidy (clarithromycin, azithromycin), účinné jsou i tetracykliny, co-trimoxazol nebo chloramphenicol. Léčba by měla trvat 14 dní.

Cíl klinické validace

Validace bude prováděna za účelem stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* na základě porovnání s jiným zavedeným CE IVD diagnostikem. Mezi parametry klinické způsobilosti patří diagnostická senzitivita a specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr. V rámci této validace budou získána data klinické způsobilosti *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* vůči výsledkům vyšetření provedeným pomocí *PCR kitu FTD Bordetella (FastTrack)*.

Design validace

Stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit*

- Klinická validace bude prováděna jako retrospektivní na „left-over“ vzorcích od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky.
- Vzorky budou pomocí *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* (GeneProof) určeným pro detekci *Bordetella pertussis/parapertussis*, a to v kombinaci s validovanou izolací *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagene). Pro vyšetření metodou PCR bude použit *Rotorgene 3000* (Qiagene).
- Izoláty vzorků budou po zpracování a vyšetření pomocí *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* (GeneProof) uskladněny na smluvním klinickém pracovišti za podmínek běžných pro skladování tohoto typu klinického materiálu pro vyšetření metodou PCR.
- Následně bude provedeno vyšetření izolátů vzorků pomocí PCR kitu *FTD Bordetella* (FastTrack). Pro vyšetření metodou PCR bude použit *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad).
- V rámci klinické validace bude vyšetřeno až 20 vzorků nasopharyngeálních stěrů pozitivních na *Bordetella pertussis/parapertussis* a až 50 vzorků negativních nasopharyngeálních stěrů na přítomnost *Bordetella pertussis/parapertussis*.
- V rámci klinické validace jsou stanoveny kontrolní body následovně:
 - 1) Po vyšetření 10 pozitivních vzorků na přítomnost *Bordetella pertussis/parapertussis* a 15 vzorků negativních na přítomnost *Bordetella pertussis/parapertussis* oběma diagnostiky *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* a *FTD Bordetella* (FastTrack) bude takto definovaný soubor výsledků předán společnosti GeneProof (zadavatel validace) ve formě vyplněného Protokolu pro záznam výsledků- Results record *Bordetella pertussis/parapertussis* (Příloha č.4 Smlouvy).
 - 2) Po zpracování první kolekce vzorků ve společnosti GeneProof bude rozhodnuto v pokračování sběru a testování negativních/positivních klinických materiálů a případnému rozšíření počtu pozitivních/negativních vzorků.

Specifikace a technická dokumentace

Klinický materiál

Ke klinické validaci budou použity „left-over“ vzorky nasopharyngeálních stěrů od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky *Bordetella pertussis/parapertussis* pomocí *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* (GeneProof).

Specifikace FTD Bordetella (FastTrack)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

FTD Bordetella is an in vitro test for the detection of bacterial nucleic acid in nasopharyngeal swabs of human origin as an aid in the evaluation of infections caused by Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. Streptococcus equi serves as an internal control (IC) to assure a successful extraction and exclude PCR inhibitions

Specifikace GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit (GeneProof)

PCR kit je určen pro detekci a diferenciaci Bordetella pertussis a Bordetella parapertussis metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR).

Detekce a diferenciaci B. pertussis a B. parapertussis je založena na principu amplifikace multikopiových inzerčních sekvencí IS1002 (specifické pro obě Bordetella pertussis/parapertussis) a IS1001 (specifické pouze pro B. parapertussis) a na měření nárůstu fluorescence. GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit je jedním z mála kitů na trhu, který neposkytuje falešně pozitivní výsledky pro Bordetella holmesii. Přítomnost B. pertussis je indikována pouze nárůstem fluorescence fluoroforu FAM. Přítomnost B. parapertussis je indikována nárůstem fluorescence v kanálech FAM i Cy5. V reakční směsi je zabudován Interní Standard (IS) kontrolující možnou inhibici PCR (verze ISIN), nebo je dodáván samostatně a kontroluje i kvalitu izolace DNA (verze ISEX). Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální citlivost. Ready to Use MasterMix obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) eliminující možnou kontaminaci PCR amplifikačními produkty. Kit je určen pro in vitro diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

Specifikace QIAamp® DNA Mini kit (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

QIAcube is a robotic automated machine for automated purification of DNA, RNA and proteins using the conventional Qiagen spin-column kits.

Specifikace Rotorgene 3000 (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The Rotor-Gene multi-filter system can detect all available real-time chemistries including Sybr-Green, dual-labelled and MGB probes, FRET and Molecular Beacons.

The Rotor-Gene can detect product at high sensitivity without the need for specialised reaction vessels (ie: optical clear caps or glass capillaries). Each unit also provides the flexibility of an interchangeable rotor system to allow for the throughput needs of the day. Provided standard are a 36 well rotor (0.2ml thin walled reaction vessels) and 72 well high throughput rotor (0.1ml strip tubes). The rotors can be interchanged for easy transition from moderate to high throughput applications.

Specifikace CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The CFX96 Touch System is a powerful, precise, and flexible real-time PCR detection system. This six-channel (five colors and one FRET channel) real-time PCR instrument combines advanced optical technology with precise temperature control to deliver sensitive, reliable detection for singleplex or multiplex reactions.

Quickly set up runs and monitor amplification traces in real time on the integrated LCD touch screen, or use the included CFX Maestro Software to easily and intuitively design your experiment and analyze results from a connected computer. With up to five-target detection, unsurpassed thermal cycler performance, unrivaled stand-alone functionality, and powerful yet easy-to-use software, the CFX96 Touch System is designed to advance your qPCR.

Benefity a analýza rizik

- Získání dat potvrzujících klinickou relevanci použití *GeneProof Bordetella pertussis/parapertussis PCR Kit* (GeneProof) v rámci detekce tohoto patogenu z nasopharyngeálních stěrů, jakožto standardního klinického materiálu pro tento typ detekce.
- Klinický důkaz potvrzující vysokou úroveň bezpečnosti a funkční způsobilosti, která je v souladu s obecnými požadavky na bezpečnost a funkční způsobilost.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o observační typ validace s využitím pouze mražených „left-over“ vzorků od anonymních pacientů, nehrozí žádná rizika směrem k pacientovi. Získaná data budou použita pouze k účelům srovnání obou diagnostik.

Statistické zpracování dat

Na základě získaných dat bude vypracována 2x2 kontingenční tabulka, která bude sloužit jako podklad pro výpočet dříve definovaných parametrů. Výsledky testů budou zapisovány do samostatného dokumentu, který bude sloužit jako podklad pro statistické zpracování. Dokument bude veden jako Příloha č. 4 – Protokol pro záznam výsledků - Results record *Bordetella pertussis/parapertussis*.

Příloha č. 5

Design klinické validace *Mycoplasma pneumoniae*

**Validace za účelem stanovení klinické způsobilosti
*GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit***

Zadavatel a sponzor validace:

GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119

619 00 Brno

IČ: 26981947

DIČ: CZ26981947

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 4415

Zastoupena: [REDACTED], CEO, předsedou představenstva

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Zkoušející:

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

IČ: 71009396

DIČ: CZ71009396

státní příspěvková organizace nezapsaná ve veřejném rejstříku

Zastoupena: Ing. Eduardem Ježem, ředitelem

(dále jen „ZÚ Ostrava“)

Klinické pracoviště:

Oddělení molekulární biologie

Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

(dále jen „Klinické pracoviště“)

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Klinické pozadí

Mycoplasma pneumoniae je primárním patogenem dýchacího traktu. Patří do skupiny bakterií, které netvoří pevnou buněčnou stěnu. Způsobuje široké spektrum onemocnění (faryngitis, tracheobronchitis, bronchitis, bronchiolitis, pneumoniae, pneumonitis, otitis acuta, bulózní hemorrhagická myringitis) od asymptomatického průběhu, přes katary HCD až po pneumonie doprovázené teplotou, nevolností, zimnicí, kašlem a únavou (10-15 % pneumonií, jsou časté autoimunitní infekce). Onemocnění je vleklé, ale dobře léčitelné antibiotiky. Nákaza je přenosná vzduchem, kapénkovou infekcí. K epidemiím dochází zpravidla ve velkých zejména dětských kolektivech v jarních a podzimních měsících. Infekce může postihnout CNS, srdce, střevo, svaly, klouby, inkubační doba je 2-3 týdny.

Cíl klinické validace

Validace bude prováděna za účelem stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* (GeneProof) na základě porovnání s jiným zavedeným CE IVD diagnostikem. Mezi parametry klinické způsobilosti patří diagnostická senzitivita a specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr. V rámci této validace budou získána data klinické způsobilosti *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* vůči výsledkům vyšetření provedeným pomocí PCR kitu *Mycoplasma pneumoniae / Chl. pneumoniae Real-TM* (Sacace Biotechnologies)

Design validace

Stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit*

- Klinická validace bude prováděna jako retrospektivní na „left-over“ vzorcích od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky.
- Vzorky byly vyšetřeny pomocí *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* (GeneProof) určeným pro detekci *Mycoplasma pneumoniae* v kombinaci s validovanou izolací *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagene). Pro vyšetření metodou PCR byl použit *Rotorgene 3000* (Qiagene).
- Izoláty vzorků byly po zpracování a vyšetření pomocí *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* (GeneProof) uskladněny na smluvním klinickém pracovišti za podmínek běžných pro skladování tohoto typu klinického materiálu pro vyšetření metodou PCR.
- Následně bude provedeno vyšetření izolátů vzorků pomocí kitu *Mycoplasma pneumoniae / Chl. pneumoniae Real-TM* (Sacace Biotechnologies). Pro vyšetření metodou PCR bude použit *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad).
- V rámci klinické validace bude vyšetřeno až 20 vzorků sput pozitivních na přítomnost *Mycoplasma pneumoniae* a až 50 vzorků sput negativních na přítomnost *Mycoplasma pneumoniae*.

- V rámci klinické validace jsou stanoveny kontrolní body následovně:
 - 1) Po vyšetření 3 vzorků pozitivních na přítomnost *Mycoplasma pneumoniae* a 15 vzorků negativních na přítomnost *Mycoplasma pneumoniae* oběma diagnostiky *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* a *Mycoplasma pneumoniae / Chl. pneumoniae Real-TM* (Sacace Biotechnologies) bude takto definovaný soubor výsledků předán společnosti GeneProof (zadavatel validace) ve formě vyplněného Protokolu pro záznam výsledků – Results record *Mycoplasma pneumoniae* (Příloha č.6 Smlouvy).
 - 2) Po zpracování první kolekce vzorků ve společnosti GeneProof bude rozhodnuto v pokračování sběru a testování negativních/positivních klinických materiálů a případnému rozšíření počtu pozitivních/negativních vzorků.

Specifikace a technická dokumentace

Klinický materiál

Ke klinické validaci budou použity „left-over“ vzorky sputa od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky *Mycoplasma pneumoniae*.

Specifikace *Mycoplasma pneumoniae / Chl. pneumoniae Real-TM* (Sacace Biotechnologies)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

Chlamydomphila (formerly *Chlamydia*) *pneumoniae* causes mild pneumonia or bronchitis in adolescents and young adults. Older adults may experience more severe disease and repeated infections. Approximately 50% of young adults and 75% of elderly persons have serological evidence of previous infection. The pathogen is estimated to cause 10-20% of community-acquired pneumonia cases among adults. The estimated number of cases of *C pneumoniae pneumonia* is 300,000 cases per year.

Specifikace *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* (GeneProof)

PCR Kit je určen pro detekci *Mycoplasma pneumoniae* metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR). Detekce *M. pneumoniae* je založena na principu amplifikace sekvence DNA genu M181 kódujícího toxin CARDS a na měření nárůstu fluorescence. Přítomnost *M. pneumoniae* je indikována nárůstem fluorescence fluoroforu FAM. V reakční směsi je zabudován Interní Standard (IS) kontrolující možnou inhibici PCR (verze ISIN), nebo je dodáván samostatně a kontroluje i kvalitu izolace DNA (verze ISEX). Pozitivní amplifikace IS je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX. Detekční souprava využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální citlivost. Ready to Use MasterMix obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) eliminující možnou kontaminaci PCR amplifikačními produkty. Kit je určen pro in vitro diagnostiku a umožňuje kvalitativní detekci.

Specifikace QIAamp® DNA Mini kit (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

QIAcube is a robotic automated machine for automated purification of DNA, RNA and proteins using the conventional Qiagen spin-column kits.

Specifikace Rotorgene 3000 (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The Rotor-Gene multi-filter system can detect all available real-time chemistries including Sybr-Green, dual-labelled and MGB probes, FRET and Molecular Beacons.

The Rotor-Gene can detect product at high sensitivity without the need for specialised reaction vessels (ie: optical clear caps or glass capillaries). Each unit also provides the flexibility of an interchangeable rotor system to allow for the throughput needs of the day. Provided standard are a 36 well rotor (0.2ml thin walled reaction vessels) and 72 well high throughput rotor (0.1ml strip tubes). The rotors can be interchanged for easy transition from moderate to high throughput applications.

Specifikace CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The CFX96 Touch System is a powerful, precise, and flexible real-time PCR detection system. This six-channel (five colors and one FRET channel) real-time PCR instrument combines advanced optical technology with precise temperature control to deliver sensitive, reliable detection for singleplex or multiplex reactions.

Quickly set up runs and monitor amplification traces in real time on the integrated LCD touch screen, or use the included CFX Maestro Software to easily and intuitively design your experiment and analyze results from a connected computer. With up to five-target detection, unsurpassed thermal cycler performance, unrivaled stand-alone functionality, and powerful yet easy-to-use software, the CFX96 Touch System is designed to advance your qPCR.

Benefity a analýza rizik

- Získání dat potvrzujících klinickou relevanci použití *GeneProof Mycoplasma pneumoniae PCR Kit* (GeneProof) v rámci detekce tohoto patogenu ze sputa, jakožto standardního klinického materiálu pro tento typ detekce.
- Klinický důkaz potvrzující vysokou úroveň bezpečnosti a funkční způsobilosti, která je v souladu s obecnými požadavky na bezpečnost a funkční způsobilost.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o observační typ validace s využitím pouze mražených „left-over“ vzorků od anonymních pacientů, nehrozí žádná rizika směrem k pacientovi. Získaná data budou použita pouze k účelům srovnání obou diagnostik.

Statistické zpracování dat

Na základě získaných dat bude vypracována 2x2 kontingenční tabulka, která bude sloužit jako podklad pro výpočet dříve definovaných parametrů. Výsledky testů budou zapisovány do samostatného dokumentu, který bude sloužit jako podklad pro statistické zpracování. Dokument bude veden jako Příloha č. 6 – Protokol pro záznam výsledků - Results record *Mycoplasma pneumoniae*.

Příloha č. 7

Design klinické validace Enterovirus

**Validace za účelem stanovení klinické způsobilosti
*GeneProof Enterovirus PCR Kit***

Zadavatel a sponzor validace:

GeneProof a.s.

Vídeňská 101/119

619 00 Brno

IČ: 26981947

DIČ: CZ26981947

zapsaná v obchodním rejstříku vedeném u Krajského soudu v Brně, oddíl B, vložka 4415

Zastoupena: [REDACTED], CEO, předsedou představenstva

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Zkoušející:

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

IČ: 71009396

DIČ: CZ71009396

státní příspěvková organizace nezapsaná ve veřejném rejstříku

Zastoupena: Ing. Eduardem Ježem, ředitelem

(dále jen „ZÚ Ostrava“)

Klinické pracoviště:

Oddělení molekulární biologie

Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě, Partyzánské náměstí 2633/7, Moravská Ostrava

702 00 Ostrava

(dále jen „*Klinické pracoviště*“)

Zodpovědná osoba: [REDACTED]

Klinické pozadí

Enterovirus je rod RNA virů zahrnujících více než 100 různých sérotypů. Obecně se dělí na Polioviry, Coxsackie viry, echoviry a ostatní enteroviry. Hned po rhinovirech jsou 2. nejčastější původci běžného nachlazení člověka. Mezi nejznámější enteroviry patří Poliovirus, Enterovirus 71, Enterovirus D68 a virus Coxsackie A (nemoc rukou, nohou a úst)

Více než 90 procent infekcí způsobených non-polio enteroviry je bez příznaků nebo vede pouze k nediferencovaným horečnatým onemocněním. Dojde-li k onemocnění, spektrum a závažnost klinických projevů se mění v závislosti na věku, pohlaví, a imunitním stavu hostitele. Některé klinické syndromy (virové meningitidy a některé exantémy) jsou způsobeny více sérotypy enteroviru, zatímco jiné jsou převážně způsobeny konkrétní podskupinou enteroviru. Non-polio enteroviry (skupina A a B coxsackieviruses, echoviry a enteroviry) jsou zodpovědné za široké spektrum onemocnění u osob všech věkových skupin, i když infekce a onemocnění se vyskytují nejčastěji u kojenců a malých dětí (např. pleurodynie a myokarditida způsobená skupinou coxsackievirus B). Poliovirus způsobující dětskou přenosnou obrnu postihuje hlavně děti do 5 let věku. Jedna infekce z 200 vede k nevratné paralýze, z čehož, 5 % až 10 % pacientů umírá z důvodu znehybnění dýchacích svalů. Výskyt případů poliomyelitidy se od roku 1988 snížil o více než 99 %, což je výsledkem celosvětového úsilí o vymýcení této choroby.

Cíl klinické validace

Validace bude prováděna za účelem stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Enterovirus PCR Kit* (GeneProof) na základě porovnání s jiným zavedeným CE IVD diagnostikem. Mezi parametry klinické způsobilosti patří diagnostická senzitivita a specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, pozitivní a negativní věrohodnostní poměr. V rámci této validace budou získána data klinické způsobilosti *GeneProof Enterovirus PCR Kit* (GeneProof) vůči výsledkům vyšetření provedeným pomocí PCR kitu *Enterovirus ELITE MGB® Kit* (Elitech)

Design validace

Stanovení klinické způsobilosti *GeneProof Enterovirus PCR Kit*

- Klinická validace bude prováděna jako retrospektivní na „left-over“ vzorcích od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky.
- Vzorky budou vyšetřeny pomocí *GeneProof Enterovirus PCR Kit* (GeneProof) určeným pro detekci Enteroviru, a to v kombinaci s validovanou izolací *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagene). Pro vyšetření metodou PCR byl použit *Rotorgene 3000* (Qiagene).
- Izoláty vzorků budou po zpracování a vyšetření pomocí *GeneProof Enterovirus PCR Kit* (GeneProof) uskladněny na smluvním klinickém pracovišti za podmínek běžných pro skladování tohoto typu klinického materiálu pro vyšetření metodou PCR.
- Následně bude provedeno vyšetření izolátů vzorků pomocí kitu *Enterovirus ELITE MGB® Kit* (Elitech) Pro vyšetření metodou PCR bude použit *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems* (Bio-Rad).

- V rámci klinické validace bude vyšetřeno až 30 vzorků likvorů pozitivních na Enterovirus a až 50 vzorků likvorů negativních na přítomnost Enteroviru.
- V rámci klinické validace jsou stanoveny kontrolní body následovně:
 - 1) Po vyšetření 15 vzorků pozitivních na přítomnost Enteroviru a 15 vzorků likvorů negativních na přítomnost Enteroviru oběma diagnostiky *GeneProof Enterovirus PCR Kit* a *Enterovirus ELITE MGB® Kit* (Elitech) bude takto definovaný soubor výsledků předán společnosti GeneProof (zadavatel validace) ve formě vyplněného Protokolu pro záznam výsledků- Results record Enterovirus (Příloha č.8 Smlouvy).
 - 2) Po zpracování první kolekce vzorků ve společnosti GeneProof bude rozhodnuto v pokračování sběru a testování negativních/pozitivních klinických materiálů a případnému rozšíření počtu pozitivních/negativních vzorků.

Specifikace a technická dokumentace

Klinický materiál

Ke klinické validaci budou použity „left-over“ vzorky sputa od anonymních pacientů získaných v rámci rutinní diagnostiky Enteroviru.

Specifikace Enterovirus ELITE MGB® Kit (Elitech)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

Enterovirus ELITE MGB® Kit is a one step, reverse-transcription and real-time PCR assay designed for the detection and quantification of Enterovirus RNA. The assay is CE-IVD validated on a large range of sample types

Specifikace GeneProof Enterovirus PCR Kit (GeneProof)

PCR kit je určen pro detekci RNA Enterovirů metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR). Metoda spočívá v měření nárůstu fluorescence fluoroforem značených sond. Detekce Enteroviru je založena na amplifikaci jednokopiové 5' UTR RNA sekvence a na měření nárůstu fluorescence. Přítomnost Enteroviru je indikována nárůstem fluorescence fluoroforu FAM. V soupravě je dodávána Interní Kontrola (IC) kontrolující celý diagnostický proces, tzn. účinnost izolace RNA ze vzorku, účinnost reverzně-transkripčního kroku (přepisu RNA do cDNA) a účinnost PCR amplifikace (inhibice PCR). Pozitivní amplifikace IC je detekována ve fluorescenčním kanálu pro fluorofor HEX. Detekční souprava je určena pro in vitro diagnostiku umožňující kvalitativní i semikvantitativní detekci a využívá technologii „hot start“ minimalizující nespecifické reakce a zajišťující maximální citlivost. Ready to Use MasterMix obsahuje uracil-DNA-glykosylázu (UDG) eliminující možnou kontaminaci PCR amplifikačními produkty.

Specifikace QIAamp® DNA Mini kit (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

QIAcube is a robotic automated machine for automated purification of DNA, RNA and proteins using the conventional Qiagen spin-column kits.

Specifikace Rotorgene 3000 (Qiagene)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The Rotor-Gene multi-filter system can detect all available real-time chemistries including Sybr-Green, dual-labelled and MGB probes, FRET and Molecular Beacons.

The Rotor-Gene can detect product at high sensitivity without the need for specialised reaction vessels (ie: optical clear caps or glass capillaries). Each unit also provides the flexibility of an interchangeable rotor system to allow for the throughput needs of the day. Provided standard are a 36 well rotor (0.2ml thin walled reaction vessels) and 72 well high throughput rotor (0.1ml strip tubes). The rotors can be interchanged for easy transition from moderate to high throughput applications.

Specifikace CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad)

Popis produktu je v originálním znění garantovaným výrobcem

The CFX96 Touch System is a powerful, precise, and flexible real-time PCR detection system. This six-channel (five colors and one FRET channel) real-time PCR instrument combines advanced optical technology with precise temperature control to deliver sensitive, reliable detection for singleplex or multiplex reactions.

Quickly set up runs and monitor amplification traces in real time on the integrated LCD touch screen, or use the included CFX Maestro Software to easily and intuitively design your experiment and analyze results from a connected computer. With up to five-target detection, unsurpassed thermal cycler performance, unrivaled stand-alone functionality, and powerful yet easy-to-use software, the CFX96 Touch System is designed to advance your qPCR.

Benefity a analýza rizik

- Získání dat potvrzujících klinickou relevanci použití *GeneProof Enterovirus PCR Kit* (GeneProof) v rámci detekce tohoto patogenu z likvoru, jakožto standardního klinického materiálu pro tento typ detekce.
- Klinický důkaz potvrzující vysokou úroveň bezpečnosti a funkční způsobilosti, která je v souladu s obecnými požadavky na bezpečnost a funkční způsobilost.
- Vzhledem k tomu, že se jedná o observační typ validace s využitím pouze mražených „left-over“ vzorků od anonymních pacientů, nehrozí žádná rizika směrem k pacientovi. Získaná data budou použita pouze k účelům srovnání obou diagnostik.

Statistické zpracování dat

Na základě získaných dat bude vypracována 2x2 kontingenční tabulka, která bude sloužit jako podklad pro výpočet dříve definovaných parametrů. Výsledky testů budou zapisovány do samostatného dokumentu, který bude sloužit jako podklad pro statistické zpracování. Dokument bude veden jako Příloha č. 8 – Protokol pro záznam výsledků - Results record Enterovirus.

