

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)**

MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΟ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι μια ταχεία εξέταση με ανιχνευτή DNA (DNA probe) η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊνικού οξέως για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium kansasii* που απομονώνεται από καλλιέργεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Το *Mycobacterium kansasii* (*M. kansasii*) είναι ένα φωτοχρωμογόνο βακτήριο βραδείας ανάπτυξης που προκαλεί στον άνθρωπο χρόνια πνευμονική νόσο που ομοιάζει με τη φυματίωση (1). Οι διάσπαρτες λοιμώξεις που προκαλούνται από μη φυματιώδη (άτυπα) - μυκοβακτήρια όπως το *M. kansasii* απασχολούν όλο και περισσότερο ως θέμα δημόσιας υγείας με την επέκταση της επιδημίας AIDS στις Ηνωμένες Πολιτείες (2). Το *M. kansasii* αποτέλεσε το 3,5% των παθογόνων απομονωμένων στελεχών που αναφέρθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων το 1980 (3).

Η ενδημική προέλευση του *M. kansasii* είναι άγνωστη. Με την εκτενή δειγματοληψία εδάφους δεν στάθηκε ικανή η απομόνωση του *M. kansasii* ενώ ορισμένα στελέχη έχουν απομονωθεί στο νερό (1).

Οι κλασσικές μέθοδοι ταυτοποίησης από είδη *Mycobacterium* στηρίζονται στη χρώση δειγμάτων για οξεάντοχους βάκιλους και κατόπιν στην καλλιέργεια, μορφολογία αποικιών και κυττάρων, ρυθμό ανάπτυξης και στη συνέχεια βιοχημικές εξετάσεις. Τα κύτταρα του *M. kansasii* είναι ραβδόμορφα μέτρια έως μεγάλα και οξεάνταχα. Οι αποικίες ποικίλουν από επίπεδες σε υπερυψωμένες με ακανόνιστα άκρα και ομαλή έως ανώμαλη μορφολογία. Οι αποικίες του *M. kansasii* είναι συνήθως μη κεχρωσμένες όταν αναπτύσσονται στο σκοτάδι και γίνονται έντονα κίτρινες μετά από έκθεση στο φως (φωτοχρωμογόνες). Η παρατεταμένη έκθεση στο φως μπορεί να προκαλέσει παραγωγή σκούρων ερυθρών κρυστάλλων βί-καρωτίνης στην επιφάνεια και στο εσωτερικό των αποικιών. Οι βιοχημικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν θετικά αποτελέσματα στην αναγωγή νιτρικών, υδρόλυση tween, υδρόλυση ουρίας και δοκιμασία καταλάσης. Μπορεί να χρειαστεί μέχρι και δύο μήνες για να κατηγοριοποιηθεί σε είδος ένα απομονωμένο στέλεχος *Mycobacterium* χρησιμοποιώντας αυτές τις τυπικές τεχνικές (1, 4).

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ προσφέρει ταχεία, μη υποκειμενική και ακριβή ταυτοποίηση του *M. kansasii* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια. Οι αποικίες μπορεί να ταυτοποιηθούν μόλις είναι ορατή η ανάπτυξη. Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ταυτοποιεί οργανισμούς *M. kansasii* που απομονώνονται από καλλιέργεια σε λιγότερο από μια ώρα.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Οι εξετάσεις υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων βασίζονται στην ικανότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων να παρατάσσονται η μία απέναντι στην άλλη και να συνδέονται μεταξύ τους ειδικά σχηματίζοντας σταθερά δίκλινα σύμπλοκα (5). Το Σύστημα AccuProbe χρησιμοποιεί ένα μονόκλωνο ανιχνευτή DNA με σήμανση χημειοφωταύγειας ο οποίος είναι συμπληρωματικός στο ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου. Αφού απελευθερωθεί το ριβοσωμικό RNA από τον οργανισμό, ο σημασμένος ανιχνευτής DNA ενώνεται με το ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου για να σχηματίσει ένα σταθερό υβρίδιο DNA:RNA. Το Αντιδραστήριο Επιλογής επιτρέπει τη διαφοροποίηση του μη υβριδοποιημένου από τον υβριδοποιημένο ανιχνευτή. Τα σημασμένα υβρίδια DNA:RNA μετρώνται στον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic. Ένα θετικό αποτέλεσμα είναι μια ανάγνωση στον αναλυτή

χημειοφωταύγειας ίση ή μεγαλύτερη από το cut-off. Μια τιμή μικρότερη από αυτό το cut-off είναι ένα αρνητικό αποτέλεσμα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Σημείωση: Για πληροφορίες σχετικά με τυχόν δηλώσεις ασφάλειας και προφύλαξης που μπορεί να σχετίζονται με αντιδραστήρια, ανατρέξτε στη βιβλιοθήκη δελτίων δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheet Library) στη διαδικτυακή τοποθεσία www.hologic.com/sds.

Τα αντιδραστήρια για την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ διατίθενται σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII PROBE KIT (ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ MYCOBACTERIUM KANSASII)

Αντιδραστήριο Ανιχνευτή (Probe Reagent) (P) (4 x 5 σωληνάρια)
Mycobacterium kansasii.

Σωληνάρια Λύσης (Lysing Tubes) (LT) (1 x 20 σωληνάρια)
Γυάλινα σφαιρίδια και ρυθμιστικό διάλυμα.

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT (ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)

Αντιδραστήριο 1 (Αντιδραστήριο Λύσης) (Lysing Reagent) (1) 1 x 10 mL
ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,04% αζίδιο του νατρίου.

Αντιδραστήριο 2 (Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού) (Hybridization Buffer) (2) 1 x 10 mL
ρυθμιστικό διάλυμα.

Αντιδραστήριο 3 (Αντιδραστήριο Επιλογής) (Lysing Reagent) (3) 1 x 60 mL
ρυθμιστικό διάλυμα.

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT (ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ HOLOGIC ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)

Αντιδραστήριο Ανίχνευσης I (Detection Reagent) (RI) 1 x 240 mL
0,1% υπεροξειδίου υδρογόνου σε 0,001 N νιτρικό οξύ.

Αντιδραστήριο Ανίχνευσης II (Detection Reagent) (RI) 1 x 240 mL
1 N υδροξειδίου του νατρίου.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

A. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

B. Χρησιμοποιείτε τις παγκόσμιες εργαστηριακές προφυλάξεις ασφαλείας όταν εκτελείτε αυτή την ανάλυση (6).

Γ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά για την ταυτοποίηση του *M. kansasii* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

Δ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά τα παρεχόμενα ή ειδικά αναλώσιμα εργαστηριακά είδη.

Ε. Ο χειρισμός των καλλιεργειών και όλων των διαδικαστικών βημάτων μέχρι το βήμα αδρανοποίησης δια της θερμότητας θα πρέπει να εκτελούνται σε Θάλαμο Βιολογικής Ασφάλειας Τάξης II.

ΣΤ. Τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται σε αυτή τη συσκευασία περιέχουν αζίδιο του νατρίου που μπορεί να αντιδράσει με μόλυβδο ή χαλκό υδραυλικών σωληνώσεων σχηματίζοντας δυνητικώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Μετά την απόρριψη αυτών των αντιδραστηρίων, αραιώνετε πάντα το υλικό με μεγάλη ποσότητα ύδατος για να αποφεύγεται η συσσώρευση αζιδίου στις υδραυλικές σωληνώσεις.

Z. Αποφεύγετε την επαφή των Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) I και II με το δέρμα και το βλεννογόνο. Εάν προκύψει επαφή του δέρματος με αυτά τα αντιδραστήρια ξεπλύνετε με νερό. Εάν συμβεί απόχυση αυτών των αντιδραστηρίων, αραιώστε με νερό πριν σκουπίσετε.

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ

Τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή πρέπει να φυλάσσονται στους φακέλους από φύλλο αλουμινίου στους 2° έως 8°C. Τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή είναι σταθερά στους σφραγισμένους φακέλους μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης. Μετά το άνοιγμα, ο φάκελος θα πρέπει να ξανασφραγίζεται και τα σωληνάρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εντός δύο μηνών και πριν από την ημερομηνία λήξης.

Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορούν να φυλάσσονται μεταξύ 2° και 25°C και είναι σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση του *M.kansasii* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

A. Μέθοδος Στερεών Υλικών. Μπορεί να εξεταστεί η ανάπτυξη σε κατάλληλα στερεά υλικά, όπως από κεκλιμένα Lowenstein-Jensen ή τρυβλία Middlebrook 7H10 ή 7H11, που υποδηλώνουν *M. kansasii*. Τα δείγματα μπορούν να εξεταστούν μόλις είναι ορατή η ανάπτυξη και κατά τη διάρκεια των επόμενων εξήντα ημερών επώασης.

1. Η ανάπτυξη μπορεί να αφαιρεθεί με ένα 1 μL πλαστικό κρίκο μιας χρήσης, συρμάτινο κρίκο ή πλαστική βελόνα μιας χρήσης. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στυλεοί λόγω της μικρής ποσότητας υγρού στο οποίο κατόπιν επαναιωρούνται τα κύτταρα.

2. Αποφεύγετε να λαμβάνετε μέρος του στερεού υλικού μαζί με τα κύτταρα.

3. Ο χειριστής μπορεί να επιλέξει να ενοφθαλμίσει ένα άλλο τρυβλίο καλλιέργειας σε αυτή τη χρονική στιγμή για να επιβεβαιώσει την καθαρότητα του απομονωμένου στελέχους.

B. Μέθοδος Καλλιέργειας Ζωμού.

Με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορεί να εξεταστεί ανάπτυξη σε ζωμό Middlebrook 7H9 με θολερότητα ισοδύναμη ή μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την Πρότυπη Θολοσιμετρική κλίμακα McFarland 1. Εισάγετε ένα δείγμα 100 mL από το καλά αναμεμιγμένο εναιώρημα ζωμού στο Σωληνάριο Λύσης Αντιδραστηρίου, όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

Αντιδραστήριο Ανιχνευτή (Probe Reagent) (P)
Σωληνάρια Λύσης (Lysing Tubes) (LT)

20 Εξετάσεις

4 x 5 σωληνάρια
1 x 20 σωληνάρια

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΜΗ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

1 μL στείροι πλαστικοί κρίκοι ενοφθαλμισμού, συρμάτινοι κρίκοι, ή πλαστικές βελόνες για επιλογή αποικιών.

Έλεγχος Στελεχών καλλιέργειας

Υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα* (60° ± 1°C)

Υδατόλουτρο ή θερμοαντική πλάκα* (95° ± 5°C)
Μικροδιανεμητές (Micropipettes) (100 µL, 300 µL)
Σύστημα επαναληπτικής αναρρόφησης (Re-pipettor) (100 µL, 300 µL)
Αναδευτήρας τύπου Vortex
McFarland 1 Πρότυπο Θολοσίμετρο

* Οι θερμοαντικές πλάκες θα πρέπει να διαθέτουν οπές κατάλληλου μεγέθους για σωληνάρια 12 x 75 mm. Συνιστάται η χρήση θερμοαντικής πλάκας Hologic.

ΔΙΑΤΙΘΕΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΟΠΙΚΟ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟ HOLOGIC:

Hologic Leader 50i Luminometer (Αναλυτής χημειοφωταύγειας)
(bioMérieux ref. 39400 / Hologic Cat. No. 103100i)

Hologic Sonicator (Συσκευή Υπερήχων)
(bioMérieux ref. 39409 / Hologic Cat. No. 901104)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ HOLOGIC ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)
(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

Θερμοαντική πλάκα (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406)

Θερμοαντική πλάκα (95° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39407)

Διπλή Θερμοαντική πλάκα (60°/95° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39408)

Hologic Sonicator Rack (Στατώ συσκευής Υπερήχων)
(bioMérieux ref. 39313 / Hologic Cat. No. 104027)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

A. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

1. Για τη βέλτιστη μεταφορά των ηχητικών κυμάτων ενέργειας, το νερό πρέπει να εξαιρωθεί προσεκτικά σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

α. Προσθέστε αρκετό ζεστό νερό για να γεμίσετε το χώρο της συσκευής υπερήχων μέχρι 1 εκατ. από το επάνω μέρος της δεξαμενής νερού.

β. Λειτουργήστε τη συσκευή υπερήχων για 15 λεπτά ώστε να εξαιρωθεί καλά το νερό.

2. Ρυθμίστε μια θερμοαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 60° ± 1°C και μια άλλη θερμοαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 95° ± 1°C.

3. Ετοιμάστε τον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic για λειτουργία. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης I και II για την ολοκλήρωση των εξετάσεων.

B. ΕΛΕΓΧΟΙ

Θετικά και αρνητικά στελέχη ελέγχου θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά σε κάθε εργαστήριο σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς. Μια καλλιέργεια *Mycobacterium kansasii* (π.χ., American Type Culture Collection, ATCC #12478) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός έλεγχος ενώ μια καλλιέργεια *Mycobacterium tuberculosis* (π.χ., ATCC #25177) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός έλεγχος.

Γ. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. Επισημάνετε επαρκή αριθμό Σωληναρίων Αντιδραστηρίου Λύσης για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια ή/και τους ελέγχους.

Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.

2. Εισάγετε 100 µL του Αντιδραστηρίου 1 (Αντιδραστήριο Λύσης) και 100 µL του Αντιδραστηρίου 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού) σε όλα τα Σωληνάρια Αντιδραστηρίου Λύσης. **Εάν πρόκειται να εξεταστούν καλλιέργειες ζυμού, μην προσθέτετε Αντιδραστήριο 1 στα Σωληνάρια Αντιδραστηρίου Λύσης.**

3. Μεταφέρετε το δείγμα από στερεό υλικό ή 100 µL μιας καλά αναμεμιγμένης καλλιέργειας ζυμού στα επισημασμένα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Περιστρέψτε τον κρίκο ή τη βελόνα στο μείγμα Αντιδραστήριου 1 και Αντιδραστήριου 2 για να αφαιρέσετε τα κύτταρα, εάν εξετάζεται ανάπτυξη σε στερεά υλικά.

4. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης και ανακινήστε με Vortex για λίγο.

Δ. ΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. Πιέστε τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης μέσα στο στατώ της συσκευής υπερήχων Sonicator έτσι ώστε το μείγμα αντίδρασης που βρίσκεται στον πυθμένα του σωληναρίου να είναι βυθισμένο αλλά τα πώματα να βρίσκονται επάνω από την επιφάνεια του ύδατος. Τοποθετήστε το στατώ του Sonicator στο υδατόλουτρο υπερήχων. ΜΗΝ ΑΦΗΝΕΤΕ ΤΑ ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ ΝΑ ΑΓΓΙΖΟΥΝ ΤΟΝ ΠΥΘΜΕΝΑ Ή ΤΑ ΤΟΙΧΩΜΑΤΑ ΤΟΥ SONICATOR.

2. Υποβάλλετε σε κατεργασία υπερήχων για 15 λεπτά.

3. Τοποθετήστε τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης, που περιέχουν τους οργανισμούς που υποβλήθηκαν σε κατεργασία υπερήχων, με μια θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους $95^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$.

4. Αφαιρέστε προσεκτικά τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης από τη θερμαντική πλάκα ή το υδατόλουτρο.

Ε. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

1. Ανοίξτε το φάκελο από φύλλο αλουμινίου κόβοντας σε ευθεία γραμμή κατά μήκος το επάνω μέρος του φακέλου. Αφαιρέστε αρκετά Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια ή/και τους ελέγχους. Ξανασφραγίστε το φάκελο διπλώνοντας το ανοιγμένο άκρο αρκετές φορές και ασφαλιζοντάς το με αυτοκόλλητη ταινία ή κλιπ. **Αφήστε τον αφυγραντή μέσα στον φάκελο.**

2. Επισημάνετε επαρκή αριθμό Σωληναρίων με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια ή/και τους ελέγχους. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.

3. Εισάγετε 100 µL των δειγμάτων που έχουν υποστεί λύση από τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης στα αντίστοιχα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή.

4. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή και επώαστε για 15 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ σε υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα.

ΣΤ. ΕΠΙΛΟΓΗ

1. Αφαιρέστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή από το υδατόλουτρο ή τη θερμαντική πλάκα. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα. Εισάγετε 300 µL του Αντιδραστήριου 3 (Αντιδραστήριο Επιλογής) σε κάθε σωληνάριο. Καλύψτε ξανά τα σωληνάρια και ανακινήστε με Vortex για να αναμειχθούν εντελώς.

2. Επώαστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για 8 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ σε υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα.

3. Αφαιρέστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή από το υδατόλουτρο ή τη θερμαντική πλάκα και αφήστε τα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά τουλάχιστον. Αφαιρέστε και απορρίψτε τα πώματα. **Διαβάστε τα αποτελέσματα στον αναλυτή χημειοφωταύγειας εντός 1 ώρας από την ολοκλήρωση της εξέτασης.**

Ζ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

1. Επιλέξτε το κατάλληλο πρωτόκολλο από το μενού του λογισμικού του αναλυτή χημειοφωταύγειας.

2. Χρησιμοποιώντας ένα υγρό λεπτό χαρτί ή απορροφητικό χαρτί, σκουπίστε κάθε σωληνάριο ώστε να διασφαλίσετε ότι δεν υπάρχουν υπολείμματα στο εξωτερικό του σωληναρίου, και εισάγετε το σωληνάριο στον αναλυτή χημειοφωταύγειας σύμφωνα με τις οδηγίες του οργάνου.

3. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, αφαιρέστε το(τα) σωληνάριο(α) από τον αναλυτή χημειοφωταύγειας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

A. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ: Το Αντιδραστήριο 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού) ενδέχεται να δημιουργήσει ίζημα. Η θέρμανση και η ανάμειξη του διαλύματος στους 35° έως 60°C διαλύει το ίζημα.

B. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ: Οι αντιδράσεις Υβριδισμού και Επιλογής εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Επομένως, είναι απαραίτητο να διατηρείται το υδατόλουτρο ή η θερμομαντική πλάκα εντός του οριζόμενου εύρους θερμοκρασίας.

Γ. ΧΡΟΝΟΣ: Οι αντιδράσεις Υβριδισμού και Επιλογής εξαρτώνται από το χρόνο. Υποβάλλετε σε υβριδισμό για 15 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά. Επωάστε τα Σωληνάρια με το Αντιδραστήριο Ανιχνευτή κατά το βήμα ΕΠΙΛΟΓΗΣ για 8 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 9 λεπτά.

Δ. ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ: Το επίπεδο του νερού στο υδατόλουτρο θα πρέπει να διατηρείται ώστε να διασφαλίζεται ότι τα Σωληνάρια Αντιδραστηρίου Λύσης είναι βυθισμένα σε αυτό, αλλά όχι επάνω από το επίπεδο του δακτυλίου σφράγισης. Θα πρέπει επίσης να διασφαλίζεται ότι είναι βυθισμένο το σύνολο του όγκου του υγρού αντίδρασης στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή.

E. ΑΝΑΚΙΝΗΣΗ ΜΕ VORTEX: Είναι κρίσιμης σημασίας να υπάρχει ομοιογενές μείγμα κατά τη διάρκεια των βημάτων ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ και ΕΠΙΛΟΓΗΣ, ειδικά μετά την προσθήκη των κυττάρων στα Αντιδραστήρια 1 και 2 και μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου 3.

ΣΤ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ:

1. Οι αυξημένες αρνητικές τιμές ελέγχου (*M. tuberculosis* ATCC #25177) άνω των 10,000 RLU (Σχετικές Μονάδες Φωτός) στον αναλυτή χημειοφωταύγειας Leader ή 300 PLU (Φωτομετρικές Μονάδες Φωτός) στον αναλυτή χημειοφωταύγειας AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή ανάμειξη μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου 3 (Αντιδραστήριο Επιλογής) ή από την εξέταση ανάμικτων καλλιιεργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιιεργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

2. Οι μειωμένες θετικές τιμές ελέγχου (*M. kansasii* ATCC #12478) κάτω των 30,000 RLU στον αναλυτή χημειοφωταύγειας Leader ή 900 PLU στον αναλυτή χημειοφωταύγειας AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή αριθμό κυττάρων, ακατάλληλη κατεργασία με υπερήχους ή εξέταση ανάμικτων ή παλαιών καλλιιεργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιιεργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ βασίζονται στις ακόλουθες τιμές cut-off. Τα δείγματα που παράγουν σήματα μεγαλύτερα ή ίσα με αυτές τις τιμές cut-off θεωρούνται θετικά. Σήματα μικρότερα από αυτές τις τιμές cut-off θεωρούνται αρνητικά. Τα αποτελέσματα σε εύρος επανάληψης θα πρέπει να επαναλαμβάνονται.

	AccuLDR	Leader
	(πρώην PAL)	
Τιμή Cut-off	900 PLU	30,000 RLU
Εύρος επανάληψης	600-899 PLU	20,000-29,999 RLU

B. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αρνητικός έλεγχος (π.χ., *M. tuberculosis*, ATCC #25177) και ο θετικός έλεγχος (π.χ., *M. kansasii*, ATCC #12478) θα πρέπει να ικανοποιούν τις ακόλουθες τιμές:

	AccuLDR (πρώην PAL)	Leader
Αρνητικός έλεγχος	< 300 PLU	< 10,000 RLU
Θετικός έλεγχος	> 900 PLU	> 30,000 RLU

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος αυτή έχει εξεταστεί χρησιμοποιώντας πρόσφατη ανάπτυξη από στερεά υλικά και καλλιέργειες ζυμού που αναφέρονται στο Τμήμα ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Η αποτελεσματικότητα αυτής της εξέτασης δεν έχει αποδειχθεί σε απευθείας κλινικά δείγματα (π.χ. ούρα, κόπρανα ή αναπνευστικά δείγματα).

Τα αποτελέσματα από την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα που έχει στη διάθεσή του ο κλινικός γιατρός.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια σε πέντε τόπους χρησιμοποιώντας συνολικά 535 απομονωμένα στελέχη. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσωπεύουν 353 απομονωμένα στελέχη *M. kansasii* και 182 απομονωμένα στελέχη από 50 άλλα είδη *Mycobacterium*. Η τυπική ταυτοποίηση από καλλιέργεια περιελάμβανε ρυθμό ανάπτυξης, μορφολογία αποικιών και κυττάρων (φωτοχρωμογόνα χαρακτηριστικά), μικροσκοπική εξέταση, HPLC (Υψηλής Πίεσης Υγρή Χρωματογραφία) και βιοχημικούς προσδιορισμούς. Τα απομονωμένα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως θετικά (>30,000 RLU) ή αρνητικά (< 30,000 RLU). Το εύρος των παρατηρήσεων για αρνητικές καλλιέργειες ήταν 1,156 έως 26,655 RLU και 1,615 έως 1.181.622 RLU για θετικές καλλιέργειες. Μια σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τις τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια παρουσιάζεται παρακάτω.

AccuProbe/ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

AccuProbe Καλλιέργεια	Θετ. Θετ.	Θετ. Αρν.	Αρν. Θετ.	Αρν. Αρν.	Ευαισθησία/ Ειδικότητα	Ποσοστό Συμφωνίας
Τόπος 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Τόπος 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Τόπος 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Τόπος 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98,0%
Τόπος 5	32	0	2	0	94,1%/N/A	94,1%
Σύνολο	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

Έξι AccuProbe θετικά, αρνητικά στην καλλιέργεια απομονωμένα στελέχη από τον Τόπο 3 στάλθηκαν στα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Λοιμώξεων για ανάλυση με HPLC. Και τα έξι είχαν ταυτοποιηθεί αρχικά ως *M. gastri*, αλλά μετά από την ανάλυση με HPLC ταυτοποιήθηκαν εκ νέου ως *M. kansasii*. Η ευαισθησία και ειδικότητα από τον Τόπο 3 ήταν 97,1% και 100%, αντίστοιχα.

Η συνολική ευαισθησία, ειδικότητα και το ποσοστό συμφωνίας ήταν 98%, 100% και 98,7%, αντίστοιχα.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

A. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η ακρίβεια εντός της σειράς της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ υπολογίστηκε αναλύοντας δύο συγκεντρώσεις ριβοσωμικού RNA που απομονώθηκε από *M. kansasii* χρησιμοποιώντας 10 αντίγραφα σε μία μόνο ανάλυση.

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	10	10
Μέση Απόκριση	55,496	103,798
Τυπική Απόκλιση	3,542	3,829
Συντελεστής Διακύμανσης	6,4%	3,7%

B. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Η ακρίβεια μεταξύ των σειρών υπολογίστηκε αναλύοντας τις ίδιες δύο συγκεντρώσεις ριβοσωμικού RNA του *M. kansasii* χρησιμοποιώντας απλούς προσδιορισμούς σε 12 συνεχόμενες σειρές.

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	12	12
Μέση Απόκριση	58,001	110,715
Τυπική Απόκλιση	3,698	6,825
Συντελεστής Διακύμανσης	6,4%	5,8%

Γ. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αξιολογήθηκαν συνολικά 148 ATCC απομονωμένα στελέχη αναφοράς χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσώπευαν συνολικά 136 είδη από 44 γένη. Έντεκα απομονωμένα στελέχη *M. kansasii*, 64 απομονωμένα στελέχη 62 άλλων ειδών *Mycobacterium* και 78 απομονωμένα στελέχη από 43 άλλα γένη που αποτελούσαν ευρείς αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Όλα τα απομονωμένα στελέχη *Mycobacterium kansasii* που εξετάστηκαν έδωσαν θετικά αποτελέσματα με τη χρήση της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Όλα τα άλλα είδη *Mycobacterium* και μη στοχευόμενα γένη και είδη, που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς, έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα με τη χρήση της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

Δ. ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Το ριβοσωμικό RNA του *M. kansasii* σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1×10^{-4} mg και 5×10^{-1} mg ανά εξέταση αναλύθηκε παρουσία 30 εκατομμυρίων κυττάρων των ακόλουθων μη στοχευόμενων ειδών: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* ή *Nocardia asteroides*. Η παρουσία αυτών των μη στοχευόμενων ειδών δεν παρεμβλήθηκε με το θετικό σήμα των αραιώσεων του rRNA του *M. kansasii*, ούτε δημιούργησε θετική αντίδραση μόνη της με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM KANSASII ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Wayne, L.G., and G.P. Kubica.** 1986. The Mycobacteria. p. 1435- 1457. *In* Sneath, P.H.A, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
2. **Collins, F.M.** 1989. Mycobacterial disease, Immunosuppression, and Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:360-377.
3. **Good, R.C. and Snider, D.E. Jr.** 1982. *J. Infect. Dis.* **146**:829-833.
4. **Kent, P.T. and G.P. Kubica.** 1985. *Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. U. S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. Atlanta, GA.
5. **Kohne, D.E., A.G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*, p. 107-108. *In* C. Thornsberry, *et al.* (eds.) *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 (USA)



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Το παρόν προϊόν ενδέχεται να καλύπτεται από ένα ή περισσότερα διπλώματα ευρεσιτεχνίας στις Η.Π.Α. τα οποία μπορείτε να βρείτε στη διεύθυνση www.hologic.com/patents.

102897F-01-GREEK Rev. 003 2018-03
©1991-2018 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.