ΑΜΕΣΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ) ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Για In Vitro διαγνωστική χρήση (Συσκευασία 50 Εξετάσεων)
(bioMérieux ref.39006/Hologic Cat.No.301001)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η Άμεση Εξέταση Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης της Hologic (MTD) αποτελεί εξέταση ανίχνευσης στόχου- νουκλεϊνικού οξέος που έχει πολλαπλασιαστεί (ενισχυθεί) για την *in vitro* διαγνωστική ανίχνευση του rRNA του *Mycobacterium tuberculosis complex* σε ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί από πτύελα (προκλητά ή με απόχρεμψη), βρογχικά δείγματα (π.χ. βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις ή βρογχικές αναρροφήσεις) ή τραχειακές αναρροφήσεις.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Η αποτελεσματικότητα αυτής της εξέτασης δεν έχει αποδειχθεί για την άμεση ανίχνευση του rRNA *του M.tuberculosis* χρησιμοποιώντας άλλα κλινικά δείγματα (π.χ. αίμα, ούρα ή κόπρανα). Η απόδοση της εξέτασης MTD δεν έχει επιβεβαιωθεί για ιζήματα που έχουν επεξεργαστεί με διαφορετικό τρόπο από τον περιγραφόμενο, ή φυλάσσονται για διαφορετικές χρονικές περιόδους ή σε διαφορετικές θερμοκρασίες από αυτές που ορίζονται σε αυτό το Εσώκλειστο Οδηγιών.

Τα θετικά ιζήματα πρέπει να καλλιεργούνται ώστε να προσδιοριστεί εάν υφίστανται μυκοβακτηρίδια άλλα εκτός του *tuberculosis complex* (Mycobacterium other than tuberculosis complex) (MOTT) εκτός από το *M.tuberculosis* complex και να πραγματοποιηθεί εξέταση αντι-μυκοβακτηριδιακής ευαισθησίας.
Θα πρέπει επίσης να εκτελείται καλλιέργεια για AFB για να προσδιοριστεί ποιο από τα υποείδη του *M.tuberculosis* complex (π.χ., *M. bovis)* βρίσκεται στο δείγμα.

Παρόλο που εξετάστηκαν δείγματα παιδιών-ασθενών, ασθενών θετικών για HIV και ασθενών με λοιμώξεις MOTT κατά τις κλινικές αξιολογήσεις, οι συνολικοί αριθμοί ήταν ανεπαρκείς ώστε να βγει ένα οριστικό συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν στατιστικές διαφορές απόδοσης σε αυτούς τους ειδικούς πληθυσμούς ασθενών.

Η εξέταση MTD δεν έχει μελετηθεί για χρήση με δείγματα από ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με αντιφυματικούς παράγοντες για να προσδιοριστεί η βακτηριολογική ίαση ή η παρακολούθηση της απόκρισης σε αυτή τη θεραπεία.

Τα πολύ αιματηρά δείγματα δεν θα πρέπει να εξετάζονται με την εξέταση MTD.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Α. Για *In Vitro* διαγνωστική χρήση.

Β. Η εξέταση MTD είναι ειδική, αλλά δεν διαφοροποιεί τα μέλη του *M.tuberculosis* complex, δηλ. τα *M.tuberculosis, M.bovis, M.bovis* BCG, *M.africanum, M.microti* και *M.canetti* (13). Το *M.celatum* και οι οργανισμοί που μοιάζουν με το *M.terrae* πραγματοποιούν διασταυρούμενη αντίδραση εάν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 30 μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) ανά εξέταση. Ωστόσο, το *M.celatum* και οι οργανισμοί που μοιάζουν με το *M.terrae* κλινικά *απομονώνονται* σπάνια.

Γ. Μια αρνητική εξέταση δεν αποκλείει την πιθανότητα απομόνωσης κάποιου οργανισμού του *M.tuberculosis* complex από το δείγμα. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων μπορεί να επηρεαστούν από τη συλλογή και τη μεταφορά του δείγματος, το είδος της δειγματοληψίας, τα εργαστηριακά διαδικαστικά σφάλματα, τη λανθασμένη ταυτοποίηση του δείγματος και τα σφάλματα μεταγραφής.

Δ. Να χρησιμοποιείται μόνο για την ανίχνευση των μελών του *M.tuberculosis* complex χρησιμοποιώντας ιζήματα που προετοιμάζονται σύμφωνα με τις διαδικασίες NALC-NaOH ή NaOH που συνιστώνται από τα Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων (CDC)[7]. Η εξέταση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά με συμπυκνωμένα ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί από πτύελα (προκλητά ή με απόχρεμψη), τραχειακές αναρροφήσεις, ή βρογχικά δείγματα (π.χ. βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις ή βρογχικές αναρροφήσεις). Χρειάζεται προσοχή κατά την εκ νέου εναιώρηση του ιζήματος με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, διασφαλίστε ότι η συγκέντρωση του φωσφόρου είναι 67 mM[7].

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

ΣΤ. Χρησιμοποιείτε τις παγκόσμιες προφυλάξεις ασφαλείας όταν εκτελείτε αυτή την εξέταση[4]. Η προετοιμασία των επεξεργασμένων και εξουδετερωμένων ιζημάτων και οι διαδικασίες του MTD πρέπει να εκτελούνται χρησιμοποιώντας εφαρμογές Βιολογικής Ασφάλειας Επιπέδου 2[(5)].

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

Η. Οι επιφάνειες εργασίας, οι διανεμητές και ο εξοπλισμός πρέπει να έχουν απολυμανθεί από τα αντίγραφα RNA (RNA amplicon) με 1:1 αραίωση οικιακής χλωρίνης (1 μέρος χλωρίνης και 1 μέρος ύδατος) όπως περιγράφεται στη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ. Η επιφάνεια εργασίας μπορεί να σκουπιστεί με νερό μετά από 15 λεπτά ώστε να αφαιρεθεί η χλωρίνη.

Θ. Όταν εκτελείται αυτή η εξέταση πρέπει να χρησιμοποιούνται διανεμητές θετικής μετατόπισης ή διανεμητές πνευματικής μετατόπισης αέρα με ρύγχη με υδρόφοβα φίλτρα. Κατά τη μεταφορά προϊόντος κυτταρόλυσης από το Σωληνάριο Λύσης (Lysing Tube) στο Σωληνάριο Ενίσχυσης (Amplification Tube), πρέπει να χρησιμοποιούνται ρύγχη εκτεταμένου μήκους με υδρόφοβο φίλτρο. Για κάθε σωληνάριο αντίδρασης πρέπει να χρησιμοποιείται ξεχωριστό ρύγχος μιας χρήσης. Θα πρέπει να αποφεύγεται η κίνηση του ρύγχους του διανεμητή που περιέχει δείγμα επάνω από το στατώ των σωληναρίων. Τα χρησιμοποιημένα ρύγχη του διανεμητή πρέπει να απορρίπτονται αμέσως σε κατάλληλο δοχείο αποβλήτων βιολογικής ασφάλειας.

I. Όταν χρησιμοποιείτε επαναλαμβανόμενους διανεμητές για την προσθήκη του αντιδραστηρίου, αφού έχει προστεθεί το προϊόν κυτταρόλυσης στο σωληνάριο, αποφεύγετε την επαφή του σωληναρίου με το ρύγχος του διανεμητή ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα μεταφοράς υλικού από το ένα σωληνάριο στο άλλο. Η ροή του αντιδραστηρίου θα πρέπει να τείνει προς το εσωτερικό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωληναρίου για να αποφεύγεται το πιτσίλισμα. Η προσεκτική αναρρόφηση είναι σημαντική για την αποφυγή μόλυνσης από τη μεταφορά ιχνών.

Κ. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ξεχωριστοί διανεμητές για τα στάδια που προηγούνται του πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) και εκείνων που ακολουθούν τον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση).

Λ. Μετά την ανάγνωση των σωληναρίων αντίδρασης στον αναλυτή χημειοφωταύγειας, απολυμάνετε και απορρίψτε τα προσεκτικά όπως περιγράφεται στη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ και τις ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση του εργαστηριακού περιβάλλοντος με αντίγραφα (amplicon).

Μ. Οι κάρτες σφράγισης ή τα αποσπώμενα πώματα θα πρέπει να απορρίπτονται σε κατάλληλο δοχείο βιολογικής ασφάλειας αποβλήτων, αμέσως μετά την αφαίρεσή τους από τα σωληνάρια αντίδρασης. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα νέες κάρτες σφράγισης ή αποσπώμενα πώματα για να αποφεύγεται διασταυρούμενη μόλυνση. Τα υλικά αυτά δεν θα πρέπει να ξαναχρησιμοποιούνται ΠΟΤΕ από προηγούμενο στάδιο. Οι κάρτες σφράγισης θα πρέπει να τοποθετούνται σταθερά στο επάνω μέρος όλων των σωληναρίων αντίδρασης.

Ν. Μην καλύπτετε τα υδατόλουτρα κατά τη διάρκεια επωάσεων, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται αποσπώμενα πώματα. (Η συμπύκνωση από το κάλυμμα μπορεί να είναι ενδεχόμενη πηγή μόλυνσης.)

Ξ. Απαιτείται κατάλληλη ανάδευση σε Vortex μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου Επιλογής (Selection Reagent) ώστε να επιτυγχάνονται ακριβή αποτελέσματα της ανάλυσης.

Ο. Συνιστάται να χρησιμοποιείται απομονωμένος χώρος για το στάδιο της Ανάλυσης Διασφάλισης Υβριδισμού (Hybridization Protection Assay (HPA)) ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα μόλυνσης της ανάλυσης με αντίγραφα (amplicon). Αυτή η αποκλειστική περιοχή θα πρέπει να διαχωρίζεται από τις περιοχές προετοιμασίας δειγμάτων και αντιδραστηρίων και πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης).

Π. Για την πρόληψη της μόλυνσης των εργαστηριακών χώρων με αντίγραφα (amplicon), ο εργαστηριακός χώρος θα πρέπει να είναι διαρρυθμισμένος με ροή εργασίας μιας κατεύθυνσης. Για παράδειγμα, προχωρήστε από την περιοχή προετοιμασίας δειγμάτων και αντιδραστηρίων στην περιοχή πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) και μετά στις περιοχές HPA. Τα δείγματα, ο εξοπλισμός και τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να επιστρέφουν στο χώρο όπου εκτελέστηκε προηγούμενο στάδιο. Επίσης, το προσωπικό δεν θα πρέπει να κινείται σε χώρους προηγούμενης εργασίας χωρίς τις κατάλληλες προφυλάξεις κατά της μόλυνσης. Συνιστάται ο θάλαμος βιολογικής ασφάλειας που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία δειγμάτων να μη χρησιμοποιείται για την εκτέλεση της εξέτασης MTD.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η εξέταση MTD χρησιμοποιεί τον Πολλαπλασιασμό (Ενίσχυση) με ενδιάμεση Μεταγραφή (Transcription-Mediated Amplification) (TMA) και την Ανάλυση Διασφάλισης Υβριδισμού (Hybridization Protection Assay) (HPA[2]) για την ποιοτική ανίχνευση του ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέως (rRNA) του *M.tuberculosis complex*. Η εξέταση MTD ανιχνεύει το rRNA τόσο σε αναπτυσσόμενους όσο και σε μη αναπτυσσόμενους σε καλλιέργεια οργανισμούς. Το *M.tuberculosis complex* περιλαμβάνει τους οργανισμούς *M.tuberculosis, M.bovis, M.bovis* BCG, *M.africanum, M.microti* και *M.canetti* (12,13). Η εξέταση MTD ανιχνεύει όλους τους οργανισμούς του *M.tuberculosis complex*. Ωστόσο, το *M.microti* μολύνει μόνο ζώα, το *M.bovis* μεταδίδεται σπάνια από μολυσμένα ζώα στον άνθρωπο, και το *M.africanum* προκαλεί πνευμονικές νόσους στον άνθρωπο στην τροπική Αφρική (12). Το *M.tuberculosis* είναι, με μεγάλη διαφορά, το πιο συνηθισμένο μέλος του σύμπλοκου που ευθύνεται για την ανθρώπινη νόσο παγκοσμίως. Αναφέρθηκε πρόσφατα από το CDC μια αύξηση του επιπολασμού της φυματίωσης που σχετίζεται με το AIDS, περιστατικά αλλοδαπών, και αυξημένη μετάδοση σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (6,9). Επίσης σημειώθηκε αύξηση στον αριθμό των στελεχών του *M.tuberculosis* που είναι ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα αντιφυματικά φάρμακα[11]. Οι επιπτώσεις αυτών των γεγονότων στη δημόσια υγεία είναι σημαντικές.

Οι συμβατικές μεθοδολογίες καλλιέργειας μπορούν να ανιχνεύσουν την ανάπτυξη της φυματίωσης από την 1η εβδομάδα, αλλά μπορεί να απαιτηθούν ακόμη και 8 εβδομάδες για την ανίχνευση [7,10]. Συγκριτικά, η εξέταση MTD παρέχει την ανίχνευση του rRNA του *M.tuberculosis complex* εντός 2.5 έως 3.5 ωρών μετά την έναρξη της διαδικασίας της εξέτασης. Συνεπώς, ενώ η εξέταση MTD δεν μπορεί να διαπιστώσει την ευαισθησία στα φάρμακα, μπορεί να οδηγήσει στη γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση του *M.tuberculosis*. Κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε καταλληλότερη χρήση των μέσων απομόνωσης, την πιο κατάλληλη έναρξη θεραπείας, και πρώιμη ανίχνευση και περιορισμό επαφών που προκαλούν μόλυνση[3].

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η εξέταση MTD είναι μια εξέταση δύο σταδίων, κατά την οποία ο πολλαπλασιασμός (ενίσχυση) και η ανίχνευση λαμβάνουν χώρα σε ένα σωληνάριο. Αρχικά, απελευθερώνονται τα νουκλεϊνικά οξέα από τα μυκοβακτηριδιακά κύτταρα με κατεργασία με υπέρηχους. Χρησιμοποιείται θερμότητα για την αποδιάταξη των νουκλεϊνικών οξέων και τη διάσπαση της δευτερογενούς δομής του rRNA. Η μέθοδος Πολλαπλασιασμός (Ενίσχυση) με ενδιάμεση Μεταγραφή (Transcription-Mediated Amplification) (TMA) της χρησιμοποιώντας σταθερή θερμοκρασία 42 °C, πολλαπλασιάζει (ενισχύει) ένα ειδικό μυκοβακτηριδιακό rRNA στόχο μέσω μεταγραφής με ενδιάμεσο στάδιο DNA, με αποτέλεσμα πολλαπλά αντίτυπα του μυκοβακτηριδιακού RNA αντίγραφου (RNA amplicon).

Οι ειδικές αλληλουχίες του *M.tuberculosis complex* ανιχνεύονται στα RNA αντίγραφα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Ανάλυσης Διασφάλισης Υβριδισμού της (Hybridization Protection Assay) (HPA) [2]. Το Αντιδραστήριο Υβριδισμού (Hybridization Reagent) του *Mycobacterium Tuberculosis* περιέχει ένα μονόκλωνο DNA ανιχνευτή (DNA probe) με σήμανση χημειοφωταύγειας. Ο ανιχνευτής αυτός είναι συμπληρωματικός με τις ειδικές αλληλουχίες του *M.tuberculosis complex*. Όταν σχηματίζονται σταθερά υβρίδια RNA: DNA μεταξύ του ανιχνευτή και των ειδικών αλληλουχιών, ο υβριδοποιημένος ανιχνευτής επιλέγεται και μετράται στον αναλυτή χημειοφωταύγειας Leader™.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ (ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ 50 ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ)

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 εξέταση MTD παρέχονται ως ακολούθως:

Ονομασία Αντιδραστηρίου	**Όγκος**
ΔΙΣΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ) ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ	
Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Δείγματος Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) (SDB) *Tris Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει* <3% απορρυπαντικό	1 x 2,5 mL
Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent)(A) *Νουκλεϊνικά οξέα λυοφιλοποιημένα σε tris ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει παράγοντα αύξησης όγκου 5%*	1 x 3 mL ετά την ανασύσταση)
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Amplification Buffer)(AB) *Υδατικό διάλυμα που περιέχει συντηρητικά*	1 x 3 mL
Αντιδραστήριο Ελαίου Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Oil Reagent)(O) *Έλαιο Σιλικόνης*	1 x 10 mL
Αντιδραστήριο Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Reagent) (E) *Αντίστροφη μεταγραφάση και RNA πολυμεράση λυοφιλοποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES που περιέχει <10% παράγοντα αύξησης όγκου και ≥15 mM N-ακετυλ-L-κυστείνη*	1 x 1,5 mL
Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) (EDB) *Tris Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα και γλυκερόλη*	1 x 1,5 mL

ΔΙΣΚΟΣ ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ	
Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent)(H) *<100 ng/ φιαλίδιο μη μολυσματικού ανιχνευτή DNA με σήμανση χημειοφωταύγειας λυοφιλοποιημένο σε ρυθμιστικό διάλυμα succinate που περιέχει παράγοντα αύξησης όγκου και απορρυπαντικό*	1 x 6 mL *(μετά την ανασύσταση)*
Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού (Mycobacterium Hybridization Buffer)(HB) *Ρυθμιστικό διάλυμα succinate που περιέχει <4% απορρυπαντικό*	1 x 6 mL
Αντιδραστήριο Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S) *Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού άλατος που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα*	1 x 15 mL
Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Lysing Tubes)(LT) *Υάλινα Σφαιρίδια, Παράγοντας αύξησης όγκου* Σωληνάρια	2 x 25

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ

A. Τα παρακάτω υγρά ή μη ανασυσταμένα συστατικά πρέπει να φυλάσσονται στους 2 °C έως 8 °C και παραμένουν σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Δείγματος (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) Μυκοβακτηριδίου (SDB)
- Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Amplification Buffer) (AB)
- Αντιδραστήριο Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Reagent) (E)
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) (EDB)
- Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H)

Το *ανασυσταμένο* Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A) παραμένει σταθερό για 2 μήνες στους 2 °C έως 8 °C. Το Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H) και το Αντιδραστήριο Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Reagent) (E) παραμένουν σταθερά για 1 μήνα στους 2 °C έως 8 °C μετά την ανασύσταση, ή για 2 μήνες σε θερμοκρασία -20 °C ή χαμηλότερη, εάν φυλάσσονται ως κατεψυγμένα κλάσματα την ημέρα της αρχικής ανασύστασης. Τα κατεψυγμένα κλάσματα πρέπει να χρησιμοποιούνται την ημέρα της απόψυξης. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα.

B. Τα ακόλουθα συστατικά της συσκευασίας παραμένουν σταθερά εφόσον φυλάσσονται στους 2 °C έως 25 °C μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

- Αντιδραστήριο Ελαίου Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Oil Reagent) (O)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB)
- Αντιδραστήριο Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S)
- Σωληνάρια λύσης Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Lysing Tubes) (LT)

ΣΥΛΛΟΓΗ, ΦΥΛΑΞΗ, ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συλλογή και Φύλαξη Δειγμάτων:

Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται σε στείρους πλαστικούς περιέκτες και να φυλάσσονται στους 2 °C έως 8 °C μέχρι τη μεταφορά ή επεξεργασία τους. Τα δείγματα που περιλαμβάνονται στην κλινική δοκιμή φυλάχτηκαν για χρονικό διάστημα μέχρι 4 ημέρες (γενικά λιγότερο από 24 ώρες) πριν από την επεξεργασία.

Μεταφορά:

Μεταφέρετε τα δείγματα στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατό σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.

Επεξεργασία (Εξουδετέρωση και Συμπύκνωση):

Τα δείγματα που περιέχουν πολύ αίμα δεν θα πρέπει να εξετάζονται με την εξέταση MTD. Η εξέταση MTD έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση του rRNA σε μέλη του *M.tuberculosis complex* χρησιμοποιώντας ιζήματα που έχουν προετοιμαστεί με γενικά πρόσφατες αποδεκτές προσαρμογές των πρωτοκόλλων εξουδετέρωσης NALC-NaOH ή NaOH που περιγράφονται από το CDC χρησιμοποιώντας 1% έως 1.5% NaOH για 15 έως 20 λεπτά και φυγοκέντρηση στις ≥3,000 x g [7].

Φύλαξη Επεξεργασμένου Ιζήματος:

Τα ιζήματα μπορούν να φυλάσσονται στους 2 °C έως 8 °C για διάστημα μέχρι 3 ημέρες πριν από την εξέταση. Τα ιζήματα μπορούν επίσης να φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20 °C ή -70 °C για διάστημα μέχρι 6 μήνες. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα.

ΥΛΙΚΑ

Α. Παρεχόμενα Υλικά
(bioMérieux ref.39006/Hologic Cat.No.301001) **50 Εξετάσεις**

ΔΙΣΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ) ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Δείγματος Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) (SDB)	1 x 2.5 mL
Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A)	1 x 3 mL (μετά την ανασύσταση)
Ρυθμιστικό διάλυμα Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Amplification Buffer)(AB)	1 x 3 mL
Αντιδραστήριο Ελαίου Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Oil Reagent) (O)	1 x 10 mL
Αντιδραστήριο Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Reagent)(E)	1 x 1.5 mL (μετά την ανασύσταση)
Ρυθμιστικό Διάλυμα Αραίωσης Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) (EDB)	1 x 1.5 mL

ΔΙΣΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H)	1 x 6 mL (μετά την ανασύσταση)
Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB)	1 x 6 mL
Αντιδραστήριο Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S)	1 x 15 mL
Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Lysing Tubes) (LT)	2 x 25
Σωληνάρια Κάρτες Σφράγισης	1 συσκευασία

Β. Απαιτούμενα μη παρεχόμενα υλικά

- Μικροδιανεμητές ικανοί να διανείμουν 25 μL, 50 μL, 100 μL, 200 μL, 300 μL, και 450 μL
- Αναδευτήρας τύπου Vortex
- Στείρο ύδωρ (διηθημένο ή τοποθετημένο σε αυτόκαυστο)
- Σωληνάρια καλλιέργειας
- Στείρα γυάλινα σφαιρίδια 3 mm
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης με βιδωτό κάλυμμα
- Θετικά Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) (π.χ., *M.tuberculosis*, ATCC 25177 ή ATCC 27294)
- Αρνητικά Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) (π.χ., *M.gordonae*, ATCC 14470,ή *M.terrae,* ATCC 15755)
- Οικιακή χλωρίνη (5.25% υποχλωριώδες διάλυμα)
- Καλύμματα εργαστηριακών πάγκων με πλαστική ενίσχυση
- Ρύγχη διανεμητών 1000 μL με υδρόφοβα φίλτρα

Γ. Συμπληρωματικά Υλικά που διατίθενται από τον τοπικό Αντιπρόσωπο Hologic:

Leader 50i Luminometer (Αναλυτής χημειοφωταύγειας) (bioMérieux ref.39400 / Hologic Cat.No.103100i)
Sonicator (Συσκευή υπερήχων) (bioMérieux ref.39409 / Hologic Cat.No.901104)
Συσκευασία Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) (bioMérieux ref.39300 / Hologic Cat.No.201791)
Οροί ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) MTD (MTD Amplification Controls) (bioMérieux ref.39223 / Hologic Cat.No.301043F)
Dry Heat Bath[A] (Θερμαντικές πλάκες) (42 ° ± 1 °C, 60 ° ± 1 °C, και 95 ° ± 5 °C) (bioMérieux ref.39405, 39406, 39407 / Hologic Cat.Nos. 105524, 105524F, 105524J)
Sonicator Rack (Στατώ συσκευής Υπερήχων) (bioMérieux ref.39313 / Hologic Cat.No.104027)
Στατώ δοκιμαστικών σωληναρίων (bioMérieux ref.39311 / Hologic Cat.No.104769)
Ρύγχη διανεμητών εκτεταμένου μήκους με υδρόφοβα φίλτρα (1250 μL) (bioMérieux ref.39315 / Hologic Cat.No.104316)
Σωληνάρια πολυπροπυλενίου,12 x 75 mm (bioMérieux ref.39308 / Hologic Cat.No.102440)
Αποσπώμενα πώματα πολυπροπυλενίου για σωληνάρια 12 x 75 mm (bioMérieux ref.39320 / Hologic Cat.No.400713)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Έλεγχοι

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για το Θετικό Κυτταρικό Έλεγχο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) θα πρέπει να ανήκουν στο *M.tuberculosis complex*, όπως το μη παθογόνο H37Ra (ATCC 25177) ή το παθογόνο H37Rv (ATCC 27294). Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τον Αρνητικό Κυτταρικό Έλεγχο θα πρέπει να είναι MOTT, όπως *M.gordonae* (ATCC 14470) ή *M.terrae* (ATCC 15755). Οι έλεγχοι πρέπει να προετοιμάζονται πριν από την εξέταση του δείγματος.

Τα κύτταρα ελέγχου πρέπει να περιέχουν 25 - 150 CFU ανά 50 μL έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τελική συγκέντρωση 1 - 10 CFU ανά ανάλυση. Αυτή η συγκέντρωση θα πρέπει να επικυρώνεται με καλλιέργεια. Αυτά τα κύτταρα ελέγχου θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν στην προετοιμασία του Ελέγχου Επεξεργασίας Δείγματος. (Βλέπε Προετοιμασία Δείγματος.)

1. Προτεινόμενη Προετοιμασία Κυττάρων Ελέγχου

α. Τοποθετήστε 3 έως 5 αποστειρωμένα γυάλινα σφαιρίδια 3 mm σε καθαρό σωληνάριο καλλιέργειας.

β. Προσθέστε 1-2 mL στείρου ύδατος. Προσθέστε αρκετούς 1 μL κρίκους ανάπτυξης από την κατάλληλη καλλιέργεια. Καλύψτε το σωληνάριο και ανακινήστε σε vortex επανειλημμένως σε υψηλ-ρή ταχύτητα.

γ. Αφήστε το εναιώρημα να καθιζάνει για 15 λεπτά.

δ. Μεταφέρετε το υπερκείμενο σε καθαρό σωληνάριο καλλιέργειας. Ρυθμίστε τη θολερότητα στο ισοδύναμο πρότυπου θολοσίμετρου α #1 McFarland χρησιμοποιώντας μια αναφορά McFarland.

ε. Ετοιμάστε μια αραίωση 1:100 του εναιωρήματος τοποθετώντας 100 μL του εναιωρήματος #1 McFarland σε 10 mL στείρου ύδατος. Καλύψτε και ανακινήστε σε vortex. Αυτή είναι η Αραίωση 1.

στ. Ετοιμάστε μια δεύτερη αραίωση 1:100 τοποθετώντας 100 μL από την Αραίωση 1 σε 10 mL στείρου ύδατος. Καλύψτε και ανακινήστε σε vortex. Αυτή είναι η Αραίωση 2. Η αραίωση αυτή θα πρέπει να περιέχει περίπου 25 - 150 CFU ανά 50 μL.

Διαίρεση σε κλάσματα και Φύλαξη Κυττάρων Ελέγχου

α. Οι αραιώσεις πρέπει να διαχωρίζονται σε καθαρά σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1.5 mL με βιδωτό καπάκι ως κλάσματα μιας χρήσης (500 μL) και να φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20 °C για 6 μήνες ή στους -70 °C για 1 χρόνο. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα.

Η εξέταση του συνιστώμενου θετικού κυττάρου ελέγχου για το *M.tuberculosis* παρέχει έλεγχο μόνο για σημαντική ανεπάρκεια του αντιδραστηρίου. Ο θετικός ορός ελέγχου είναι σχεδιασμένος για την παρακολούθηση της επίδρασης των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία σχετικά με παρεμβολές από πλεόνασμα NaOH και φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος. Οι διαδικαστικές διακυμάνσεις συγχρονισμού ή θερμοκρασιών οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) ή την επάρκεια του χρόνου επιλογής μπορεί να μην ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας τα συνιστώμενα κύτταρα ελέγχου. Συμπληρωματικοί οροί ελέγχου μπορούν να εξεταστούν σύμφωνα με τις οδηγίες ή ειδικές απαιτήσεις.

2. Έλεγχος Αναστολής Δείγματος

Εάν η εξέταση MTD είναι αρνητική και ο κλινικός έχει έντονη υποψία ότι ο ασθενής πάσχει από φυματίωση, είναι δυνατός ο έλεγχος αναστολής δείγματος χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαδικασία:

α. Τοποθετήστε 50 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Αραίωσης Δείγματος (Specimen Dilution Buffer) σε 2 Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT) (με υλικό (seeded) και χωρίς υλικό (unseeded)).

β. Προσθέστε 50 μL Θετικά Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) και 450 μL ιζήματος σε 1 σωληνάριο (με υλικό (seeded)). Προσθέστε 450 μL ιζήματος στο δεύτερο σωληνάριο (χωρίς υλικό (unseeded)). Προχωρήστε με την εξέταση ως συνήθως.

Ερμηνεία

Εάν η τιμή RLU του σωληναρίου με το υλικό (seeded) είναι 30.000, τότε το δείγμα δεν αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) και προφανώς δεν υπήρχε διαθέσιμος στόχος για πολλαπλασιασμό (ενίσχυση). Εάν η τιμή RLU του σωληναρίου με το υλικό (seeded) είναι μικρότερη από 30.000, τότε το δείγμα αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) και θα πρέπει να αξιολογηθεί άλλο δείγμα. Εάν η επαναλαμβανόμενη εξέταση του δείγματος χωρίς υλικό (unseeded) είναι θετική, το αποτέλεσμα της εξέτασης MTD μπορεί να αναφερθεί ως θετικό. Η πιθανότερη εξήγηση για αυτού του τύπου το αποτέλεσμα είναι η μεταβλητότητα της τυχαίας δειγματοληψίας, δηλ. ότι το πρώτο κλάσμα δεν περιείχε στόχο για πολλαπλασιασμό (ενίσχυση), ενώ το δεύτερο κλάσμα περιείχε. Η τιμή RLU του σωληναρίου χωρίς υλικό (unseeded) μπορεί να είναι θετική ή αρνητική γιατί το κλάσμα του ιζήματος μπορεί να περιέχει ή να μην περιέχει rRNA *M.tuberculosis*.

3. Έλεγχος Παρακολούθησης Εργαστηριακής Μόλυνσης

Για την παρακολούθηση της εργαστηριακής μόλυνσης με αντίγραφα (amplicon) ή κύτταρα του M.tuberculosis, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ακόλουθη διαδικασία:

α. Τοποθετήστε 1 mL στείρου ύδατος σε ένα καθαρό σωληνάριο. Εμποτίστε ένα στείρο στυλεό από πολυεστέρα ή dacron με στείρο ύδωρ.

β. Σκουπίστε το χώρο του πάγκου ή τον εξοπλισμό που θα εξεταστεί.

γ. Τοποθετήστε το στυλεό μέσα στο νερό και στροβιλίστε απαλά. Αφαιρέστε το στυλεό ενώ τον πιέζετε κατά μήκος του σωληναρίου. Απορρίψτε το στυλεό σε περιέκτη που περιέχει αραίωση 1:1 οικιακής χλωρίνης.

δ. Προσθέστε 25 μL από το ύδωρ που περιέχει το υλικό του εκθλιμμένου στυλεού σε ένα Σωληνάριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) που περιέχει 50 μL Αντιδραστηρίου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) (Amplification Reagent) και 200 μL Αντιδραστηρίου Ελαίου (Oil Reagent).

ε. Ακολουθήστε τη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ για πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) και ανίχνευση.

Ερμηνεία

Εάν τα αποτελέσματα είναι ≥30.000 RLU, η επιφάνεια είναι μολυσμένη και θα πρέπει να απολυμανθεί με επεξεργασία με χλωρίνη, όπως συνιστάται στην ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ, Προετοιμασία Εξοπλισμού. Εάν υπάρχει υποψία μόλυνσης του υδατόλουτρου, 25 μL ύδατος υδατόλουτρου μπορούν να πολλαπλασιαστούν (ενισχυθούν) όπως

περιγράφεται για το υλικό εκθλιμμένου στυλεού, εφόσον δεν χρησιμοποιούνται αντιμικροβιακά στο υδατόλουτρο.

Προετοιμασία Εξοπλισμού

1. Για τη βέλτιστη μεταφορά των ηχητικών κυμάτων ενέργειας σε μια συσκευή υπερήχων, το νερό πρέπει να εξαερωθεί προσεκτικά σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία πριν από κάθε σειρά:

α. Προσθέστε αρκετό νερό βρύσης θερμοκρασίας δωματίου για να γεμίσετε το χώρο της συσκευής υπερήχων μέχρι 1/2 ίντσα από το επάνω μέρος της δεξαμενής νερού.

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

2. Ρυθμίστε 1 **θερμαντική πλάκα** στους 95 °C, 1 **θερμαντική πλάκα** ή υδατόλουτρο στους
60 °C και άλλη μία **θερμαντική πλάκα** ή υδατόλουτρο στους 42 ° ± 1 °C.

3. Σκουπίστε τις επιφάνειες εργασίας, τον εξοπλισμό και τους διανεμητές με αραιωμένη 1:1 οικιακή χλωρίνη πριν αρχίσετε. Η χλωρίνη πρέπει να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια για 15 λεπτά τουλάχιστον. Οι επιφάνειες εργασίας πρέπει να σκουπιστούν με νερό για να αφαιρεθεί η χλωρίνη. Καλύψτε την επιφάνεια στην οποία θα εκτελεστεί η εξέταση με καλύμματα εργαστηριακών πάγκων με πλαστική ενίσχυση.

4. Ετοιμάστε τον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic Leader για λειτουργία. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχουν επαρκείς ποσότητες Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) I και II για να ολοκληρώσετε τις εξετάσεις και διασφαλίστε ότι έχουν πληρωθεί οι σωλήνες άντλησης με τα αντιδραστήρια. Αναφερθείτε στο Εγχειρίδιο Χρήσης του Οργάνου για περισσότερες οδηγίες σχετικά με τη φόρτωση των Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης. (Τα Αντιδραστήρια Ανίχνευσης διατίθενται χωριστά).

Προετοιμασία Αντιδραστηρίου

Ανασυστήστε το φιαλίδιο (50 εξετάσεων) λυοφιλοποιημένου Αντιδραστηρίου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A) με 3.0 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (AB). Ανακινήστε σε vortex μέχρι να αναμειχθεί το διάλυμα. Αφήστε το *ανασυσταμένο* αντιδραστήριο να μείνει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να γίνει διαυγές. Το ανασυσταμένο Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) (A) μπορεί να φυλάσσεται στους 2 °C έως 8 °C για 2 μήνες. Το ανασυσταμένο Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης θα πρέπει να αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

Προετοιμασία Δείγματος

1. Τοποθετήστε ετικέτες σε επαρκή αριθμό Σωληναρίων Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT) για την εξέταση των δειγμάτων και σε 1 για τον καθένα Θετικό

και Αρνητικό Κυτταρικό Έλεγχο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) ή για το Θετικό και Αρνητικό Έλεγχο Επεξεργασίας Δείγματος.Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.

2. Διανείμετε 50 μL Ρυθμιστικού Διαλύματος Αραίωσης Δείγματος Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) (SDB) σε όλα τα Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Lysing Tubes) (LT). Ακολουθήστε τις οδηγίες Α ή Β που παρουσιάζονται παρακάτω για τους ορούς ελέγχου και το Γ για τα δείγματα.

1. α. Έλεγχος Επεξεργασίας Δείγματος:

Για κάθε έλεγχο, προσθέστε 1 mL του διαλύματος NALC/NaOH και 3 mL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των πτυέλων με 1 mL στείρου ύδατος σε ένα σωληνάριο επεξεργασίας δείγματος.

i. Ανακινήστε σε vortex για να αναμειχθεί.

ii. Μεταφέρετε 450 μL του NALC/NaOH/φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος και 50 μL του αραιωμένου Ελέγχου Κυττάρων στο αντίστοιχα επισημασμένο Σωληνάριο Λύσης Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Lysing Tubes) (LT).

β. Εάν χρησιμοποιούνται Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης), μεταφέρετε 450 μL Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) από τον περιέκτη του στο αντίστοιχα επισημασμένο Σωληνάριο Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT).

γ. Δείγμα: Μεταφέρετε 450 μL εξουδετερωμένου, καλά ανακινημένου σε vortex δείγματος από τον περιέκτη του στο αντίστοιχα επισημασμένο Σωληνάριο Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT).

3. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT) μετά την προσθήκη κάθε δείγματος.

4. Ανακινήστε σε vortex για 3 δευτερόλεπτα.

Λύση Δείγματος

1. Πιέστε τα Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT) μέσα στο στατώ της συσκευής υπερήχων Sonicator έτσι ώστε το μείγμα **αντίδρασης** που βρίσκεται στο 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 αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά. Τα δείγματα και οι οροί ελέγχου που έχουν υποβληθεί σε κατεργασία υπερήχων ονομάζονται τώρα «προϊόντα κυτταρόλυσης». ΜΗΝ ΑΝΑΚΙΝΕΙΤΕ ΣΕ VORTEX ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΣΗΣ.

Πολλαπλασιασμός (Ενίσχυση)

1. Τοποθετήστε ετικέτες στα σωληνάρια πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) (σωληνάρια πολυπροπυλενίου 12 x 75 mm) κοντά στο επάνω άκρο του σωληναρίου και αναγράψτε αριθμούς που αντιστοιχούν σε αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν στα Σωληνάρια Λύσης Μυκοβακτηριδίου (LT). Επίσης τοποθετήστε ετικέτες στα σωληνάρια πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) για κάθε Θετικό και Αρνητικό Κυτταρικό Έλεγχο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης). Εάν χρησιμοποιούνται RNA οροί ελέγχου, τοποθετήστε ετικέτες στα σωληνάρια πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) με επισήμανση που αντιστοιχεί στους Αρνητικούς και Θετικούς Ορούς Ελέγχου.

2. Προσθέστε 50 μL *ανασυσταμένο* Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) Μυκοβακτηριδίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) στον πυθμένα κάθε σωληναρίου πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο διανεμητή. Προσθέστε 200 μL Αντιδραστήριο Ελαίου Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Oil Reagent) (O) σε κάθε σωληνάριο πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο διανεμητή.

3. ΜΗΝ ΑΝΑΚΙΝΕΙΤΕ ΣΕ VORTEX ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΣΗΣ. Μεταφέρετε 25 μL προϊόντος κυτταρόλυσης στο κάτω μέρος του κατάλληλα επισημασμένου σωληναρίου πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) χρησιμοποιώντας διαφορετικό εκτεταμένου μήκους ρύγχος διανεμητή με υδρόφοβο φίλτρο για κάθε μεταφορά. Το προϊόν κυτταρόλυσης που απομένει πρέπει να φυλάσσεται στους 2 °C έως 8 °C για διάστημα μέχρι 7 ημερών ή στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20 °C ή χαμηλότερη για διάστημα μέχρι 1 μήνα. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα. Εάν πρόκειται να εκτελεστούν επιπλέον εξετάσεις σε προϊόντα κυτταρόλυσης ασθενών, αφήστε το αποθηκευμένο προϊόν κυτταρόλυσης να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. ΜΗΝ ΑΝΑΚΙΝΕΙΤΕ ΣΕ VORTEX ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΣΗΣ.

4. Επωάστε τα σωληνάρια στους 95 °C για 15 λεπτά, αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά, σε θερμαντική πλάκα.

5. Προετοιμάστε το μείγμα ενζύμων προσθέτοντας 1.5 mL Ρυθμιστικού Διαλύματος Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) (EDB) στο λυοφιλοποιημένο Αντιδραστήριο Ενζύμων Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Enzyme Reagent) (E). Ανακινήστε για να αναμειχθεί. Μην αναμιγνύεται σε vortex. Το *ανασυσταμένο* Αντιδραστήριο Ενζύμων παραμένει σταθερό για 1 μήνα στους 2 °C έως 8 °C ή για 2 μήνες σε θερμοκρασία -20 °C ή χαμηλότερη εφόσον φυλάσσεται υπό μορφή κατεψυγμένων κλασμάτων [B] από την ημέρα της αρχικής ανασύστασης. Εάν πραγματοποιείτε εξέταση με κατεψυγμένα ενζυμικά κλάσματα, αφήστε πρώτα το κατεψυγμένο κλάσμα να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, μην αποψύχετε τα κλάσματα σε υψηλές θερμοκρασίες. Για να αναμείξετε το κλάσμα μετά την απόψυξη, αναρροφήστε απαλά και απορρίψτε το μείγμα με επαναλαμβανόμενο διανεμητή πριν το προσθέσετε στα σωληνάρια ενίσχυσης.

6. Μεταφέρετε τα σωληνάρια σε θερμαντική πλάκα 42 ° ± 1 °C ή σε υδατόλουτρο και αφήστε τα να κρυώσουν για 5 λεπτά. ΜΗΝ ΑΦΗΝΕΤΕ ΤΑ

ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ ΝΑ ΚΡΥΩΣΟΥΝ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ. ΜΗΝ ΚΑΛΥΠΤΕΤΕ ΤΟ ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ.

7. Προσθέστε 25 μL μείγματος ενζύμων σε κάθε σωληνάριο πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο διανεμητή ενώ τα σωληνάρια βρίσκονται σε θερμοκρασία 42 ° ± 1 °C. Ανακινήστε για να αναμειχθεί. Επωάστε στους 42 °C για 30 λεπτά, αλλά όχι για περισσότερο από 60 λεπτά. Οι κάρτες σφράγισης ή τα αποσπώμενα πώματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου επώασης. ΜΗΝ ΚΑΛΥΠΤΕΤΕ ΤΟ ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ.

8. Τα σωληνάρια μπορούν να καλυφθούν και να τοποθετηθούν στους 2 °C έως 8 °C για διάστημα μέχρι 2 ώρες ή στους -20 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας μετά από την 30λεπτη επώαση. Εάν φυλαχτούν στους -20 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας, τα σωληνάρια πρέπει να αποψυχθούν εντελώς σε θερμοκρασία δωματίου ή σε θερμοκρασία όχι μεγαλύτερη των 60 °C πριν από το στάδιο του Υβριδισμού. Εάν κρατηθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τα αποσπώμενα πώματα και όχι οι κάρτες σφράγισης.

Υβριδισμός

1. Πραγματοποιείστε ανασύσταση στο λυοφιλοποιημένο Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηρίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H) με 6 mL Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB). Το Αντιδραστήριο Υβριδισμού Μυκοβακτηρίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H) και το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB) πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την ανασύσταση. Εάν το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB) έχει τοποθετηθεί στο ψυγείο, θερμαίνετε στους 60 °C ενώ το ανακινείτε απαλά για να διασφαλιστεί ότι έχουν διαλυθεί όλα τα συστατικά. Ανακινήστε σε vortex μέχρι το διάλυμα να είναι διαυγές (αυτό μπορεί να διαρκέσει μέχρι 1 λεπτό) για να διασφαλίσετε ότι όλα τα συστατικά έχουν διαλυθεί. Το *ανασυσταμένο* Αντιδραστήριο Υβριδισμού παραμένει σταθερό για 1 μήνα στους 2 °C έως 8 °C ή για δύο μήνες σε θερμοκρασία -20 °C ή χαμηλότερη εφόσον φυλάσσεται υπό μορφή κατεψυγμένων κλασμάτων [Γ] κατά την ημέρα της αρχικής ανασύστασης. Εάν το *ανασυσταμένο* Αντιδραστήριο Υβριδισμού έχει τοποθετηθεί στο ψυγείο ή την κατάψυξη, θερμάνετε στους 60 °C ενώ το ανακινείτε απαλά για να διασφαλιστεί ότι έχουν διαλυθεί όλα τα συστατικά.

2. Προσθέστε 100 μL *ανασυσταμένου* Αντιδραστηρίου Υβριδισμού σε κάθε σωληνάριο χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο διανεμητή. Καλύψτε τα σωληνάρια με κάρτες σφράγισης ή αποσπώμενα πώματα. Ανακινήστε σε vortex 3 φορές για 1 ολόκληρο δευτερόλεπτο **τουλάχιστον** κάθε φορά[Δ] σε μεσαία ταχύτητα. Για να επιτύχετε σωστή ανάμειξη στα σωληνάρια αντίδρασης, διατηρείστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση και αφήστε το μείγμα αντίδρασης να φθάσει το άνω ήμισυ τμήμα του τοιχώματος του σωληναρίου μέσω της διαδικασίας ανακίνησης σε vortex. (Για να αποφύγετε πιθανή μόλυνση, μην αφήνετε το μείγμα αντίδρασης να έρθει σε επαφή με τις κάρτες σφράγισης ή τα πώματα.) Μετά από επαρκή ανακίνηση σε vortex, το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να έχει ένα ενιαίο κίτρινο χρώμα.

3. Επωάστε στους 60 °C για 15 λεπτά, αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά, σε θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο.

Επιλογή

1. Το Αντιδραστήριο Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S) πρέπει να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της εξέτασης. Αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο ή τη θερμαντική πλάκα των 60 °C και προσθέστε 300 μL Αντιδραστηρίου Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S) χρησιμοποιώντας επαναλαμβανόμενο διανεμητή. Καλύψτε τα σωληνάρια με κάρτες σφράγισης ή αποσπώμενα πώματα. Ανακινήστε σε vortex 3 φορές για 1 ολόκληρο δευτερόλεπτο **τουλάχιστον** κάθε φορά Δ σε μεσαία ταχύτητα. Για να επιτύχετε σωστή ανάμειξη στα σωληνάρια αντίδρασης, διατηρείστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση και αφήστε το μείγμα αντίδρασης να φθάσει το άνω ήμισυ τμήμα του τοιχώματος του σωληναρίου μέσω της διαδικασίας ανακίνησης σε vortex. (Για να αποφύγετε πιθανή μόλυνση μην αφήνετε το μείγμα αντίδρασης να έρθει σε επαφή με τις κάρτες σφράγισης ή τα πώματα.) Μετά από επαρκή ανακίνηση σε vortex, το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να έχει ενιαίο ρόδινο χρώμα.

2. Επωάστε τα σωληνάρια στους 60 °C για 15 λεπτά, αλλά όχι περισσότερο από 16 λεπτά, σε θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο.

3. Αφαιρέστε τα σωληνάρια από το υδατόλουτρο ή τη θερμαντική πλάκα. Αφήστε τα σωληνάρια να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά τουλάχιστον, αλλά όχι περισσότερο από 1 ώρα. Αφαιρέστε τις κάρτες σφράγισης ή τα πώματα ακριβώς πριν από την ανίχνευση.

Ανίχνευση

1. Επιλέξτε το κατάλληλο πρωτόκολλο από το μενού του λογισμικού του αναλυτή χημειοφωταύγειας . Χρησιμοποιήστε χρόνο ανάγνωσης 2 δευτερολέπτων.

2. Χρησιμοποιώντας ένα υγρό **λεπτό χαρτί ή απορροφητικό χαρτί** χωρίς χνούδι, 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. Τα σωληνάρια πρέπει να διαβάζονται εντός 1 ώρας από το Στάδιο Επιλογής 3.

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

4. Μετά την ανάγνωση των σωληναρίων αντίδρασης, γεμίστε τα προσεκτικά μέχρι το χείλος με αραίωση οικιακής χλωρίνης 1:9 χρησιμοποιώντας φιάλη εκτόξευσης υγρού που διαθέτει εγχυτήρα**.** Αφήστε τα σωληνάρια να μείνουν με τη χλωρίνη για 1 ώρα τουλάχιστον, πριν τα απορρίψετε. Αυτό βοηθά στην πρόληψη μόλυνσης με αντίγραφα (amplicon) στο εργαστηριακό περιβάλλον.

5. Τα στατώ των δοκιμαστικών σωληναρίων, συμπεριλαμβανομένων των στατώ που χρησιμοποιούνται για τα δείγματα και τις δοκιμασίες θα πρέπει να απολυμαίνονται με πλήρη βύθιση σε αραίωση 1:1 οικιακής χλωρίνης με νερό για ελάχιστο διάστημα 15 λεπτών. Κατόπιν, η χλωρίνη πρέπει να ξεπλένεται με νερό και τα στατώ να σκουπίζονται ή να αφήνονται να στεγνώσουν.

6. Απολυμάνετε τις εργαστηριακές επιφάνειες και τον εξοπλισμό χρησιμοποιώντας αραίωση οικιακής χλωρίνης 1:1.

Επανάληψη Εξέτασης

1. Εάν πρόκειται να εκτελεστούν επιπλέον εξετάσεις σε προϊόντα κυτταρόλυσης δειγμάτων ασθενών, αφήστε το προπαρασκευασμένο προϊόν κυτταρόλυσης να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. ΜΗΝ ΑΝΑΚΙΝΕΙΤΕ ΣΕ VORTEX ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΛΥΣΗΣ.

2. Ακολουθήστε το πρωτόκολλο της ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ όπως περιγράφεται, αρχίζοντας με το στάδιο του πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Α. Αντιδραστήρια

1. Το Αντιδραστήριο Ενζύμου δεν θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από 15 λεπτά μετά την ανασύστασή του.

2. Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB) ενδέχεται να δημιουργήσει ίζημα. Η θέρμανση και η ανάμειξη του Ρυθμιστικού Διαλύματος Υβριδισμού Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Hybridization Buffer) (HB) ή του *ανασυσταμένου* Αντιδραστηρίου Υβριδισμού στους 60 °C διαλύει το ίζημα.

Β. Θερμοκρασία

1. Οι αντιδράσεις πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης), υβριδισμού και επιλογής εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Βεβαιωθείτε ότι το υδατόλουτρο ή η θερμαντική πλάκα διατηρείται εντός του οριζόμενου εύρους θερμοκρασίας.

2. Τα σωληνάρια πρέπει να παρέλθουν στους 42 °C για 5 λεπτά πριν την προσθήκη του μείγματος ενζύμων για βέλτιστη απόδοση της ενίσχυσης.

3. Η θερμοκρασία είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό (ενίσχυση) (42 ° ± 1 °C).

Γ. Χρόνος

Είναι σημαντικό να τηρούνται τα χρονικά όρια που ορίζονται στη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.

Δ. Υδατόλουτρο

1. Το επίπεδο του ύδατος στο υδατόλουτρο θα πρέπει να διατηρείται σε τέτοιο ύψος ώστε να διασφαλίζεται ότι βυθίζεται όλη η ποσότητα του υγρού αντιδραστηρίου που βρίσκεται στα σωληνάρια αντίδρασης, αλλά ταυτόχρονα το επίπεδο του ύδατος δεν πρέπει να είναι τόσο υψηλό ώστε να εισέρχεται το ύδωρ μέσα στα σωληνάρια.

2. Κατά τη διάρκεια του σταδίου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης), δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται το κάλυμμα του υδατόλουτρου ώστε να διασφαλίζεται ότι **προϊόν συμπύκνωσης** δεν μπορεί να στάξει μέσα ή επάνω στα σωληνάρια.

E. Ανακίνηση σε Vortex

Είναι σημαντικό να υπάρχει ομοιογενές μείγμα κατά τη διάρκεια των σταδίων Υβριδισμού και Επιλογής, ιδιαίτερα μετά την προσθήκη του ανασυσταμένου Αντιδραστηρίου Υβριδισμού Μυκοβακτηρίου Φυματίωσης (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) (H) (το μείγμα αντίδρασης θα έχει ενιαίο κίτρινο χρώμα) και του Αντιδραστηρίου Επιλογής Μυκοβακτηριδίου (Mycobacterium Selection Reagent) (S) (το μείγμα αντίδρασης θα έχει ενιαίο ρόδινο χρώμα). Η ανακίνηση σε Vortex είναι ο χειρισμός ενός διαλύματος ώστε να παραχθεί ένα ενιαίο εναιώρημα. Όταν τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο και τους παρέχεται εξωτερική πηγή ενέργειας, παράγεται μια γρήγορη περιστροφή του διαλύματος γύρω από τον άξονα του σωληναρίου. Το αποτέλεσμα αυτής της γρήγορης περιστροφής είναι η παραγωγή ενός ενιαίου εναιωρήματος εξέτασης. Κατά τη διάρκεια της ανακίνησης σε Vortex, τα σωληνάρια θα πρέπει να διατηρούνται σε όρθια, κάθετη θέση και να στηρίζονται από το επάνω μέρος του σωληναρίου ώστε να διασφαλίζεται η επίτευξη επαρκούς ανακίνησης στο vortex. Εάν επιτευχθεί επαρκής ανακίνηση στο vortex, το εναιώρημα ακολουθεί κυκλική κίνηση σε ταχύτητα ικανή να ανασηκώσει το διάλυμα σε ύψος που κυμαίνεται στο άνω ήμισυ του σωληναρίου. Κατά τη διάρκεια των σταδίων Υβριδισμού και Επιλογής, αυτός ο χειρισμός εφαρμόζεται διαδοχικά 3 φορές και η ανακίνηση σε vortex διαρκεί τουλάχιστον 1 ολόκληρο δευτερόλεπτο κάθε φορά.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Το αποτέλεσμα του δείγματος, όταν εξετάζεται χρησιμοποιώντας την Άμεση Εξέταση ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ) Μυκοβακτηρίου Φυματίωσης (MTD), ερμηνεύεται με βάση ένα αρχικό αρνητικό αποτέλεσμα (<30.000 RLU), ένα αρχικό θετικό αποτέλεσμα (≥ 500.000 RLU), ή ένα αρχικό αμφίβολο αποτέλεσμα (30.000 έως 499.999 RLU). Η εξέταση MTD θα πρέπει να επαναλαμβάνεται από το προϊόν κυτταρόλυσης που έχει απομείνει όταν το αρχικό αποτέλεσμα της εξέτασης είναι αμφίβολο. Το επαναλαμβανόμενο αποτέλεσμα του προϊόντος κυτταρόλυσης που είναι >30.000 θεωρείται θετικό.

A. Αποτελέσματα και Αποδοχή Ποιοτικού Ελέγχου

Οι έλεγχοι θα πρέπει να παράγουν τις παρακάτω τιμές:

- Αρνητικά Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) <20.000 RLU
- Θετικά Κύτταρα Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) ≥ 500.000 RLU
- Αρνητικός Έλεγχος Επεξεργασίας Δείγματος <20.000 RLU
- Θετικός Έλεγχος Επεξεργασίας Δείγματος ≥ 1.000.000 RLU.

Τα αποτελέσματα της εξέτασης των ασθενών δεν πρέπει να αναφέρονται εάν οι τιμές των έλεγχων της εξέτασης MTD δεν πληρούν τα παραπάνω κριτήρια. Βλέπε το κεφάλαιο ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ για περισσότερες πληροφορίες.

Οι τιμές στόχοι για τους ορούς ελέγχου θα πρέπει να προσδιορίζονται σε κάθε εργαστήριο χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της εξέτασης για κάθε παρτίδα προετοιμασμένων ορών ελέγχου.

B. Αποτελέσματα Εξέτασης Ασθενή

Εάν οι οροί ελέγχου δεν αποδίδουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα, δεν θα πρέπει να απελευθερώνται τα αποτελέσματα της εξέτασης των δειγμάτων του ασθενή της ίδιας σειράς.

Αποτελέσματα:

- 500.000 RLU θετικό για rRNA *M.tuberculosis complex*
- < 30.000 RLU αρνητικό για rRNA *M.tuberculosis complex*
- 30.000 έως 499.999 RLU πιθανό θετικό για rRNA *M.tuberculosis complex*, επαναλάβετε για επικύρωση των αποτελεσμάτων:

  Επαναλάβετε ≥ 30.000 RLU θετικό για rRNA *M.tuberculosis complex*

  Επαναλάβετε <30.000 RLU αρνητικό για rRNA *M.tuberculosis complex*

ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα από την εξέταση MTD θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα που έχει στη διάθεσή του ο κλινικός γιατρός. Βάσει του βαθμού κλινικής υποψίας, θα πρέπει να μελετηθεί η εξέταση συμπληρωματικού δείγματος.

Εάν το αρχικό αποτέλεσμα εξέτασης MTD είναι θετικό στα ≥500.000 RLU, ή εάν το αποτέλεσμα της επανάληψης της εξέτασης MTD είναι θετικό στα ≥30.000 RLU, τότε πρέπει να αναφερθούν τα παρακάτω:

Αναφορά:	Ανιχνεύτηκε rRNA του Mycobacterium Tuberculosis *complex*. Επίχρισμα AFB (θετικό ή αρνητικό).
Συμπληρωματικά Στοιχεία:	Εκκρεμεί καλλιέργεια AFB. Το δείγμα ενδέχεται να περιέχει MOTT και M.tuberculosis ή μόνο M.tuberculosis. Η εξέταση αυτή δεν θα πρέπει να αποτελεί τη μόνη βάση για τη διάγνωση φυματίωσης. Η θετική τιμή πρόβλεψης για έναν ασθενή με αρνητικό επίχρισμα

	είναι χαμηλότερη από αυτή ενός ασθενή με θετικό επίχρισμα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε πληθυσμούς εξέτασης όπου η επικράτηση της φυματίωσης είναι χαμηλή και οι θετικές τιμές πρόβλεψης διαγνωστικών μεθόδων παρουσιάζουν αντίστοιχη μείωση.

Εάν το αρχικό ή επαναληπτικό αποτέλεσμα της εξέτασης MTD είναι αρνητικό στις <30.000 RLU, τότε αναφέρετε τα παρακάτω:

Αναφορά:	Δεν ανιχνεύτηκε rRNA του Mycobacterium Tuberculosis *complex*. Επίχρισμα AFB (θετικό ή αρνητικό).
Συμπληρωματικά Στοιχεία:	Δεν ανιχνεύτηκε rRNA του Mycobacterium Tuberculosis *complex*. Εκκρεμεί καλλιέργεια AFB. Το δείγμα ενδέχεται να μην περιέχει *M. Tuberculosis,* το αποτέλεσμα μπορεί να είναι λανθασμένα αρνητικό λόγω των χαμηλών αριθμών *M.tuberculosis* παρουσία ή απουσία MOTT, ή το αποτέλεσμα μπορεί να είναι λανθασμένα αρνητικό λόγω παρεμβολής αναστολέων δείγματος στην ανάλυση. Συνιστάται η εξέταση άλλου δείγματος του ασθενή εάν υπάρχει κλινική υποψία ενεργής φυματίωσης ή αναστολής δείγματος.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Να χρησιμοποιείται μόνο για την ανίχνευση μελών του *M.tuberculosis complex* χρησιμοποιώντας ιζήματα που προετοιμάζονται με τήρηση των διαδικασιών NALC-NaOH ή NaOH που συνιστώνται από την CDC[7]. Η εξέταση αυτή μπορεί να χρησιμοποιείται αποκλειστικά με ιζήματα που προετοιμάζονται από πτύελα (προκλητά ή με απόχρεμψη), τραχειακές αναρροφήσεις ή βρογχικά δείγματα (π.χ. βρογχοκυψελιδικές εκπλύσεις και βρογχικές αναρροφήσεις).

Η εξέταση MTD είναι ειδική, αλλά δεν διαφοροποιείται για τα μέλη του σύμπλοκου *M.tuberculosis*, δηλ., *M.tuberculosis, M.bovis, M.bovis* BCG, *M.africanum, M.microti* και ο *M.canetti* και οι οργανισμοί που μοιάζουν με *M.terrae* έχουν διασταυρούμενη αντίδραση εάν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 30 CFU ανά εξέταση. Ωστόσο, ο *M.celatum* και οι οργανισμοί που ομοιάζουν με *M.terrae* αποτελούν σπάνιες κλινικές απομονώσεις.

Τα αποτελέσματα της εξέτασης μπορεί να επηρεαστούν από τη συλλογή και μεταφορά του δείγματος, το είδος της δειγματοληψίας, τα εργαστηριακά διαδικαστικά σφάλματα, τη λανθασμένη ταυτοποίηση του δείγματος και τα σφάλματα μεταγραφής. Μια αρνητική εξέταση δεν εξαιρεί την πιθανότητα απομόνωσης ενός οργανισμού του σύμπλοκου *M.tuberculosis* από το δείγμα.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Α. Εύρος Τιμών Ορών Ελέγχου που Παρατηρήθηκαν στις Κλινικές Μελέτες

Το εύρος RLU των ορών ελέγχου που παρατηρήθηκε σε μια κλινική μελέτη 7 σημείων ήταν:

	RLU (N=704)	
	Εύρος	**Μέση τιμή**
Θετικά κύτταρα ελέγχου πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης)	556.245 έως > 2.000.000	>2.000.000
Αρνητικά κύτταρα ελέγχου πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης)	901 έως 18.754	3.041

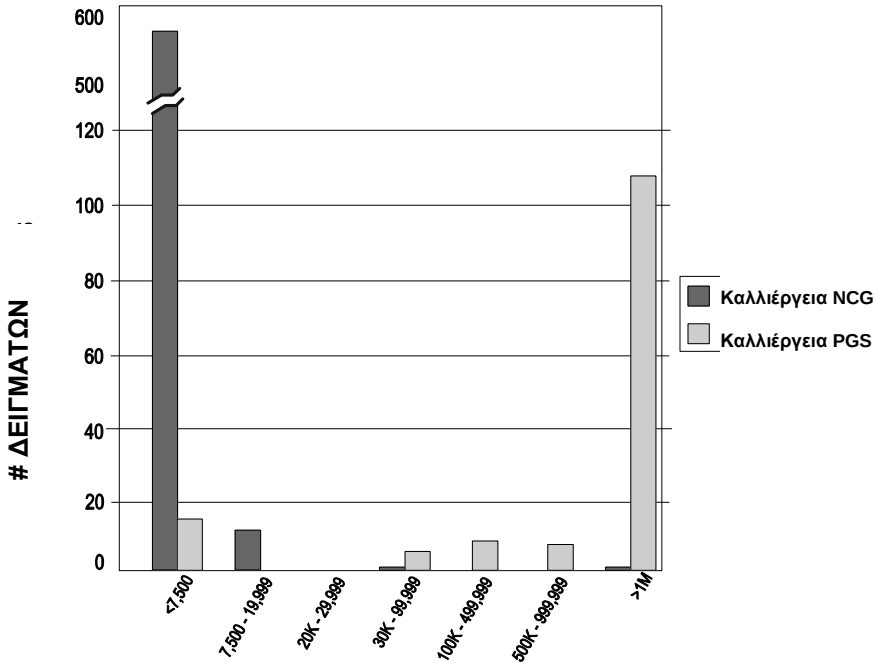
Β. Εύρος Τιμών RLU για Κλινικά Δείγματα

Το εύρος των τιμών RLU για τα 127 δείγματα που ήταν θετικά στην εξέταση MTD ήταν 35.777 έως >2.000.000 RLU.

Για τα 577 αρνητικά δείγματα στην εξέταση MTD, το εύρος των τιμών ήταν 573 έως 19.176 RLU.

Η κατανομή συχνότητας των τιμών RLU για όλα αυτά τα δείγματα μετά την επίλυση των ασυμφωνιών εμφανίζεται παρακάτω: Η επίλυση ασυμφωνιών βασίζεται στην παρουσία θετικών δειγμάτων άλλης καλλιέργειας από τον ίδιο ασθενή και/ή την τελική διάγνωση του θεράποντος γιατρού.

Κατανομή αποτελεσμάτων από μη επεξεργασμένα δείγματα (7 σημείων) N=704



Αποτελέσματα καλλιέργειας

M. tuberculosis NEG	**554**	**10**	**0**	**1**	**0**	**0**	**1**
M. tuberculosis POS	**13**	**0**	**0**	**4**	**7**	**6**	**108**

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Α. Κλινική Αξιολόγηση

Η πρωτότυπη εξέταση MTD αξιολογήθηκε σε μελέτες 6 σημείων κατά τις οποίες συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα επιχρίσματος AFB με τα αποτελέσματα της μυκοβακτηριακής καλλιέργειας σε 6.079 δείγματα από 2.609 ασθενείς. Από αυτά, 4.000 δείγματα συλλέχθηκαν από 1.898 ασθενείς που δεν ελάμβαναν αντιφυματική θεραπεία. Τα 6 σημεία της μελέτης παρουσίαζαν γεωγραφική ποικιλία: 5 ήταν μεγάλα μητροπολιτικά νοσοκομειακά κέντρα με κέντρα θεραπείας φυματίωσης και ένα ήταν κρατικό εργαστήριο δημόσιας υγείας.

Η τρέχουσα μορφή της εξέτασης MTD αξιολογήθηκε σε μια ξεχωριστή μελέτη 7 σημείων κατά την οποία συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της εξέτασης MTD με τα αποτελέσματα της μυκοβακτηριακής καλλιέργειας. Τα 7 σημεία της μελέτης παρουσίαζαν γεωγραφική ποικιλία, 6 σημεία ήταν μεγάλα μητροπολιτικά νοσοκομειακά κέντρα με κέντρα θεραπείας φυματίωσης και ένα ήταν επίσης εθνικό μυκοβακτηριολογικό εργαστήριο.

Το έβδομο σημείο ήταν ένα εργαστήριο δημόσιας υγείας. Εξετάστηκαν δείγματα από ασθενείς που δεν λάμβαναν θεραπεία. Από αυτά, 132 ήταν θετικές καλλιέργειες για *M.tuberculosis complex*. Η εξέταση MTD ανίχνευσε 119 από αυτά τα δείγματα θετικής καλλιέργειας, 7 δείγματα ανέπτυξαν και MOTT εκτός από *M.tuberculosis*.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΕΛΑΜΒΑΝΑΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

MTD έναντι Καλλιέργειας (N=704)

ΑΝΑ ΑΣΘΕΝΗ (Πριν το διαχωρισμό) Καλλιέργεια

		+	-
MTD	+	51	4
	-	4	221

ΑΝΑ ΑΣΘΕΝΗ (Μετά το διαχωρισμό) Καλλιέργεια

		+	-
MTD	+	56	2
	-	4	221

ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ (Πριν το διαχωρισμό) Καλλιέργεια

		+	-
MTD	+	119	8
	-	13	564

ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ (Μετά το διαχωρισμό) Καλλιέργεια

		+	-
MTD	+	125	2
	-	13	564

Οι ασθενείς για τους οποίους υπήρχε υποψία ενεργής πνευμονικής φυματίωσης και δεν ελάμβαναν θεραπεία εγγράφηκαν σε αυτή τη μελέτη. Η συνολική επικράτηση των ασθενών που είχαν θετική καλλιέργεια *M.tuberculosis* ήταν 20,5%.

Η συνολική ευαισθησία της εξέτασης MTD ανά ασθενή ήταν 93,3% και η ειδικότητα ανά ασθενή ήταν 99,1% σε σύγκριση με τα αποτελέσματα καλλιέργειας. Η συνολική ευαισθησία της εξέτασης MTD ανά δείγμα ήταν 90,6% και η ειδικότητα ανά δείγμα ήταν 99,6% σε σύγκριση με τα αποτελέσματα καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα από τα 7 σημεία για ευαισθησία, ειδικότητα, Θετική Τιμή Πρόβλεψης (PPV), και Αρνητική Τιμή Πρόβλεψης (NPV) εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα, μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95% για τις εκτιμήσεις απόδοσης. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται μετά από επίλυση ασυμφωνιών που βασίστηκε στην παρουσία θετικών δειγμάτων άλλης καλλιέργειας από τον ίδιο ασθενή και/ή την τελική διάγνωση του θεράποντος γιατρού.

Ανά Ασθενή:

	Συνολικό Ποσοστό	**Αριθμός έναντι συνόλου**	**Διάστημα εμπιστοσύνης 95%**
Ευαισθησία	93,3%	56/60	83,8% - 98,2%
Ειδικότητα	99,1%	221/223	96,8% – 99,9%
PPV	96,6%	56/58	88,1% – 99,6%
NPV	98,2%	221/225	95,5% – 99,5%

Ανά Δείγμα:

	Συνολικό Ποσοστό	**Αριθμός έναντι συνόλου**	**Διάστημα εμπιστοσύνης 95%**
Ευαισθησία	90,6%	125/138	84,4% - 94,9%
Ειδικότητα	99,6%	564/566	98,7% – 100%
PPV	98,4%	125/127	94,4% – 99,8%
NPV	97,7%	564/577	96,2% – 98,8%

Από τα 564 δείγματα που ήταν αρνητικά για σύμπλοκο *M.tuberculosis* σε καλλιέργεια και MTD, 114 δείγματα ανέπτυξαν MOTT στην καλλιέργεια, 64 ήταν από ασθενείς με άλλες θετικές καλλιέργειες για MOTT, και 169 ήταν από ασθενείς με αρνητικές μυκοβακτηριακές καλλιέργειες.

Β. Μελέτες Ακριβείας

Εξετάστηκαν ομάδες ακριβείας, που αποτελούνταν από 2 αρνητικά δείγματα, 2 χαμηλά θετικά δείγματα (ª 100 CFU//εξέταση) και 2 μέτρια υψηλά θετικά δείγματα (ª 1000 CFU//εξέταση) σε 3 σημεία. Τα θετικά δείγματα προετοιμάστηκαν με ενοφθαλμισμό **κατασκευασμένου μείγματος ιζημάτων** με **μέτρια αναστολή** με γνωστές ποσότητες *M.tuberculosis* . Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν δύο φορές την ημέρα για 3

ημέρες στα 3 σημεία. Σε κάθε σειρά συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί οροί ελέγχου ενίσχυσης.

Επειδή δεν παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση μεταξύ σημείων ή μεταξύ ημερών, τα δεδομένα από το σύνολο των τριών σημείων παρουσιάζονται παρακάτω συνδυασμένα. Οι τιμές RLU που μετρήθηκαν περιορίζονται από το σωληνάριο **φωτο-πολλαπλασιαστή** του αναλυτή χημειοφωταύγειας. Συνεπώς, οι τιμές που είναι μεγαλύτερες από 2.000.000 RLU έχουν περικοπεί. Δεν δίνονται τιμές της τυπικής απόκλισης ή % CV.

Μελέτες Ακριβείας

	Αρ. Παρατηρήσεων	% Σωστά	Εύρος (RLU)	Μέση τιμή (RLU)
Δείγμα 1 Υψηλό Θετικό	108	100%	154.103 - >2.000.000	>2.000.000
Δείγμα 2 Χαμηλό Θετικό	108	99,1%	16.324 - >2.000.000	>2.000.000
Δείγμα 3 Αρνητικό	108	100%	2.004 – 5.693	2.689
Θετικά Κύτταρα ελέγχου	54	100%	>2.000.000	>2.000.000
Αρνητικά Κύτταρα Ελέγχου	54	100%	2.272 – 4.241	2.944

* Μια παρατήρηση αρνητική

Γ. Επαναληψιμότητα

Η ομάδα επαναληψιμότητας αποτελούνταν από 25 δείγματα με Αρνητικούς Ορούς Ελέγχου πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) διάσπαρτους μεταξύ του κάθε δείγματος για σύνολο 50 δειγμάτων. Η ομάδα Επαναληψιμότητας εξετάστηκε σε 4 σημεία. Συνολικά, 100% (120/120) των αρνητικών δειγμάτων απέδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα και 98,8 % (79/80) των θετικών δειγμάτων απέδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Δ. Αναλυτική Ειδικότητα

Η ειδικότητα της εξέτασης MTD αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας βακτήρια, μύκητες και ιούς. Για τα βακτήρια και τους μύκητες, η εξέταση ειδικότητας περιελάμβανε 160 στελέχη (151 είδη από 62 γένη) στενών συγγενικών μυκοβακτηριδίων, άλλων οργανισμών που προκαλούν αναπνευστική νόσο, και φυσιολογική αναπνευστική χλωρίδα ή οργανισμούς που αποτελούν αντιπροσωπευτικό δείγμα φυλογένεσης. Στελέχη τύπου προέκυψαν από την American Type Culture Collection (ATCC), και 5 απομονώσεις προέκυψαν από κλινικά εργαστήρια. Τα προϊόντα κυτταρόλυσης προετοιμάστηκαν από ενεργά αναπτυσσόμενες καλλιέργειες (ή rRNA σε 3 περιπτώσεις) και αξιολογήθηκαν στην εξέταση MTD σύμφωνα με τη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ. Εξετάστηκαν περίπου 5 x 10^7 CFU ανά αντίδραση. Μόνο τα στελέχη του *M.tuberculosis complex* απέδωσαν θετικά αποτελέσματα, με εξαίρεση τα στελέχη *M.celatum* και τα στελέχη που μοιάζουν με *M.terrae*.

Σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 30 CFU ανά εξέταση, τα στελέχη *M.celatum* και ορισμένα στελέχη που μοιάζουν με *M.terrae* αποδίδουν θετικά αποτελέσματα στην εξέταση MTD. Στο επίπεδο των 30 CFU ανά εξέταση, ο *M.celatum* απέδωσε 26.772 RLU και οι όμοιοι με *M.terrae* κυμάνθηκαν από 19.470 έως 49.976 RLU.

Ε. Περιορισμοί Ανίχνευσης

Τριάντα (30) στελέχη *M.tuberculosis* από ευρεία γεωγραφική κατανομή, συμπεριλαμβανομένων αντιπροσωπευτικών φαρμακευτικά ανθεκτικών και φαρμακευτικά ευαίσθητων στελεχών, ανιχνεύτηκαν με την εξέταση MTD. Η εξέταση MTD ανίχνευσε 1 CFU ανά εξέταση για το σύνολο των 30 στελεχών.

ΣΤ. Ανάκτηση

Είκοσι πέντε (25) fg rRNA *Mycobacterium tuberculosis* (ισοδύναμο με 5 CFU ανά εξέταση) εξετάστηκαν παρουσία περίπου 540.000 CFU ανά εξέταση (450 μL) των ακόλουθων σχετικών μη στοχευόμενων οργανισμών: *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium* gordonae, *M.avium, M.kansasii, M.terrae, Nocardia asteroides, N.otitidis-caviarum, Corynebacterium pseudotuberculosis, C.diphtheriae, Gordona sputi,* και *Rhodococcus bronchialis*. Όλα τα αποτελέσματα της εξέτασης ήταν θετικά για rRNA του *M.tuberculosis* παρουσία αυτών των μη στοχευόμενων οργανισμών.

ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ	ΠΙΘΑΝΑ ΑΙΤΙΑ	ΣΥΝΙΣΤΩΜΕΝΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ
Αυξημένα Αρνητικά Κύτταρα Ελέγχου (Ενίσχυσης) ή Αρνητικός Ορός Ελέγχου Επεξεργασίας Δείγματος (≥20.000 RLU)	• Ανεπαρκής ανάμειξη ή προσθήκη ανεπαρκούς ποσότητας του Αντιδραστηρίου Επιλογής Μυκοβακτηριδίου Αντιδραστήριο (S).	Επίτευξη πλήρους ανάμειξης. Βεβαιωθείτε ότι προστίθεται η σωστή ποσότητα. Επικυρώστε οπτικά το ενιαίο ρόδινο διάλυμα μετά την ανακίνηση σε vortex.
	• Ανεπαρκής προσοχή κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων και εισαγωγή επακόλουθου πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) μολυσματικών υλικών ταυτόχρονα	Προσέξτε πολύ κατά την αναρρόφηση. Τα χρησιμοποιημένα σωληνάρια αντίδρασης πρέπει να απολυμαίνονται με αραίωση 1:9 οικιακής χλωρίνης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ. Οι επιφάνειες των εργαστηριακών πάγκων, οι θερμαντικές πλάκες, τα υδατόλουτρα και οι διανεμητές πρέπει να απολυμαίνονται με αραίωση 1:1 οικιακής χλωρίνης όπως περιγράφεται στη ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ.
	• Παραλήφθηκε το στάδιο της 5λεπτής επαναφοράς σε χαμηλότερη θερμοκρασία **(cool down)**.	
	• Μόλυνση της εργαστηριακής επιφάνειας ή των αντιδραστηρίων.	
	• Παράληψη σκουπίσματος των σωληναρίων πριν την ανάγνωση στον αναλυτή χημειοφωταύγειας.	Τα σωληνάρια πρέπει να σκουπίζονται με **λεπτό χαρτί ή απορροφητικό χαρτί** χωρίς χνούδι πριν την ανάγνωσή τους στον αναλυτή χημειοφωταύγειας.
	• Εκτελέστηκε το στάδιο του πολλαπλασιασμού (ενίσχυσης) εκτός του συνιστώμενου εύρους θερμοκρασίας.	Ελέγξτε τη θερμοκρασία του υδατόλουτρου και/ή της θερμαντικής πλάκας και προσαρμόστε την αναλόγως για να επιτύχετε το εύρος θερμοκρασίας που ορίζεται στη διαδικασία.
Χαμηλή τιμή Θετικών Κυττάρων Ελέγχου Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) ή Ελέγχου Επεξεργασίας Θετικού Δείγματος (<500.000 RLU)	• Προστέθηκε το Αντιδραστήριο Πολλαπλασιασμού (Ενίσχυσης) στο πλάι αντί για το κάτω μέρος του σωληναρίου.	Ανακινήστε σε vortex προσεκτικά όπως ορίζεται.
	• Ανεπαρκής ανάμειξη μετά την προσθήκη του ανασυσταμένου Αντιδραστηρίου Υβριδισμού Mycobacterium Tuberculosis	(Βλέπε Υβριδισμός, Στάδιο 2.) Επικυρώστε οπτικά ότι το διάλυμα είναι κίτρινο μετά την ανακίνηση σε vortex.
	• Προστέθηκε μεγάλη ποσότητα Αντιδραστηρίου Επιλογής.	Ελέγξτε τη ρύθμιση της ποσότητας του διανεμητή.
	• Επετράπη υπέρβαση του συνιστώμενου χρονικού ορίου για το Στάδιο Επιλογής.	Χρονομετρήστε προσεκτικά την επώαση στους 60 °C στο στάδιο Επιλογής, ώστε να είναι 15 λεπτά.
	• Επετράπη στα σωληνάρια να επανέλθουν (cool down) σε θερμοκρασία μικρότερη από 42 °C μετά την επώαση στους 95 °C.	Μεταφέρετε τα σωληνάρια απευθείας από την 95 °C θερμαντική πλάκα στους 42 °C υδατόλουτρο / θερμαντική πλάκα.
	• Φραγμένοι οι σωλήνες άντλησης Αντιδραστηρίου Ανίχνευσης.	Εκτελέστε εκπλύσεις με χλιαρό νερό, όπως περιγράφεται στο Εγχειρίδιο Χρήσης του Οργάνου.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

Α Οι θερμαντικές πλάκες πρέπει να διαθέτουν οπές κατάλληλου μεγέθους για σωληνάρια 12 x 75 mm. Συνιστάται η χρήση θερμαντικής πλάκας .

Β Για τη φύλαξη κατεψυγμένων κλασμάτων συνιστάται η χρήση σωληναρίων φυγοκέντρησης με βιδωτό πώμα. Τα ατομικά κατεψυγμένα κλάσματα μπορούν να καταψύχονται και να αποψύχονται για χρήση μόνο μια φορά. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα.

Γ Για φύλαξη κατεψυγμένων κλασμάτων συνιστάται η χρήση κρυοφιαλιδίων (cryovials) 5 mL. Τα ατομικά κατεψυγμένα κλάσματα μπορούν να καταψύχονται και να αποψύχονται για χρήση μόνο μια φορά. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καταψύκτες ψυχρού αέρα.

Δ Λόγω των διαφορών στις συσκευές vortex και τις διακυμάνσεις στον ορισμό της ταχύτητας, ενδέχεται να χρειάζεται μεγαλύτερος χρόνος ανακίνησης στο vortex ανάλογα με την κάθε συσκευή vortex. Ρυθμίστε την ταχύτητα του vortex και ακολουθήστε τις διαδικασίες χειρισμού της ανακίνησης σε vortex που περιγράφονται στο Κεφάλαιο Ε, ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ, ώστε να επιτρέπεται στο μείγμα αντίδρασης να φθάσει και να διατηρήσει το απαραίτητο ύψος στο άνω ήμισυ του σωληναρίου. Απαιτείται επαρκής ανακίνηση στο vortex για να προκύψουν ακριβή αποτελέσματα ανάλυσης. Οι χρόνοι μπορούν να αυξηθούν μέχρι 15 δευτερόλεπτα συνολικά χωρίς να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

BIBLIOGRAPHY/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA

1. Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association, 1983. *Levels of laboratory services for mycobacterial diseases.* Am. Rev. Respir. Dis. **128**:213.
2. **Arnold, L.J., P.W. Hammond, W.A. Wiese, and N.C. Nelson,** 1989. Assay formats involving acridinuim-ester-labeled DNA probes. Clin. Chem. **35**:1588-1594.
3. **Bradley, S.T., S.L. Reed and A. Catanzaro,** 1996. Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**:1606-1610.
4. Centers for Disease Control, 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. Centers for Disease Control and Prevention, and National Institute of Health. May, 1993. 3rd Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. pp. 93-96.
6. **Collins, F. M.,** 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **2**: 360-377.
7. **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.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approved Guideline. NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS; 1991.
9. **Pitchenik, A.E., D. Fertel, and A.B. Block,** 1988. *Mycobacterial Disease: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention.* Clin. Chest Med. **9**:425-441.
10. **Roberts, G.D., E.W. Koneman, and Y.K. Kim,** 1991. Mycobacterium, pp. 304-339. In A. Balows, et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. **Simone, P.M. and Iseman, M.D.,** 1992. Drug-resistant Tuberculosis: A Deadly and Growing Danger. J. Resp. Dis. **13**:960-971.
12. **Wayne, L.G.,** 1982. Microbiology of the tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. **125** (3 pt 2):31-41.
13. **Van Soolingen, D.,** et al. 1997. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Intl. J. Syst. Bacteriol. **47**:1236-1245.
14. **Kerleguer A., Koeck J. L., Fabre M.,Gérôme P., Teyssou R., Hervé V.,** 2002. Application of a Grey-Zone for the Interpretation of The “Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test ”for the Rapid Diagnosis of Respiratory Tuberculosis."Esm May 2002.
15. **Coll P.,Garrigó M., Moreno C., Marti N.,** 2002. "Routine Use of E-Mtd (Gen-Probe) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples."Esm 2002.

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

Υποστήριξη πελατών: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Τεχνική Υποστήριξη: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Για περισσότερες πληροφορίες επικοινωνίας, επισκεφθείτε τη διαδικτυακή τοποθεσία www.hologic.com.

Οι λέξεις Hologic, Amplified MTD, και Leader αποτελούν εμπορικά σήματα ή/και εμπορικά σήματα κατατεθέντα της εταιρείας Hologic, Inc. ή/και των θυγατρικών της στις Ηνωμένες Πολιτείες ή/και σε άλλες χώρες.

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.

EC REP
Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

AW-12601-1101, Rev. 003 (EL)
©1995–2018 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.
2018-03