

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFIKÁLÁSÁN ALAPULÓ KÖZVETLEN TESZT

In Vitro diagnosztikai alkalmazásra (50 db tesztkészlet)
(bioMérieux hiv. 39006/Hologic Kat. Sz. 301001)

ALKALMAZÁSI JAVALLAT30

A Hologic Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test MTD, (Mycobacterium tuberculosis amplifikálásán alapuló közvetlen teszt) egy adott célszekvencia amplifikálásával végzett nukleinsav-teszt a Mycobacterium tuberculosis-komplex RNS-ének indukált vagy felköhögött köpetből, bronchiális mintákból (például, bronchoalveolaris nedvek vagy bronchiális aspirátumok) vagy tracheális aspirátumokból történő *in vitro* diagnosztikai kimutatására.

FIGYELMEZTETÉSEK

E teszt hatékonyságát eddig még nem demonstrálták az M. tuberculosis más klinikai mintákból (például, vér, vizelet vagy széklet) történő közvetlen kimutatásában. Az MTD teszt hatékonysága nincs igazolva a csomagoláshoz mellékelt leírástól eltérő módon feldolgozott üledékek, vagy a leírásban meghatározottaktól eltérő ideig vagy hőmérsékleten történő tárolás esetén.

A pozitívnak bizonyult üledékekből tenyészetet kell létesíteni a tuberculosis-komplexben (MOTT) az M. tuberculosis-komplex mellett jelenlévő más Mycobacteriumok meghatározására és az antimikobakteriális fogékonysági teszt elvégzésére. Tenyészetet kell létesíteni az AFB-re is annak meghatározására, hogy az M. tuberculosis-komplexben-milyen afajok (például, M. bovis) vannak jelen.

Bár a klinikai értékelés során gyermekgyógyászati betegektől, HIV-pozitív betegektől, és MOTT fertőzéses betegektől származó minták tesztelésére egyaránt sor került, az összes elvégzett teszték száma nem elegendő annak egyértelmű eldöntésére, hogy van-e statisztikai különbség e specifikus betegpopulációkban mért teljesítményekben.

A bakteriológiai kezelés meghatározása vagy az ilyen terápia monitorozása céljából az MTD tesztet még nem vizsgálták tuberculosis elleni ágensekkel kezelt betegekből származó mintákon.

Nagy vértartalmú mintákat nem szabad az MTD teszttel vizsgálni.

ÖVINTÉZKEDÉSEK

- a. *In Vitro* diagnosztikai alkalmazásra.
- b. Bár az MTD teszt specifikus, de nem tud különbséget tenni az M. tuberculosis-komplex tagjai, azaz az M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microti és M. canetti, között (13). Az M. celatum- és M. terrae-szerű szervezetek kereszreakciót adnak, ha tesztenként 30 telepkepző-egységnél (colony forming units (CFU)) magasabb koncentrációkban vannak jelen. Azonban, klinikai izolátumokban csak ritkán találhatók M. celatum- és M. terrae-szerű szervezetek.
- c. Egy negatív teszt még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a mintából az M. tuberculosis-komplexbe tartozó szervezetet lehessen izolálni. A teszteredményeket befolyásolhatja a mintagyűjtés és -szállítás, az eltérő mintagyűjtés- és a laboratóriumi feldolgozás során bekövetkező hibák, a téves mintaazonosítás, illetve a transzkripció hibái.
- d. Csak az M. tuberculosis-komplex összetevőinek kimutatására lehet alkalmazni a Betegségellenőrző Központok (Centers for Disease Control (CDC)) által javasolt NALC-NaOH vagy NaOH eljárások követésével előkészített üledékek alkalmazásával⁷. Ezt a tesztet csak (indukált vagy felköhögött) köpetből, tracheális aspirátumokból vagy bronchiális mintákból (például, bronchoalveolaris nedvek vagy bronchiális aspirátumok) készített koncentrált üledékekkel lehet alkalmazni. Oda kell figyelni arra, hogy az üledék foszfátpufferben való felszuszpendálása során a foszfát koncentrációja 67 mM legyen⁷.
- e. Az I. és II. kimutató reagens (Detection Reagents I és II) lehetőleg ne ne jusson a bőrre, szembe vagy nyálkahártyára. Ha ez mégis bekövetkezik, akkor a kérdéses reagenst mossa le vízzel. Ha a reagens netalán lecseppenne, feltörlés előtt előbb vízzel kell hígítani.
- f. A teszt végrehajtására az általános elővigyázatossági szabályok vonatkoznak⁴. Emésztett és dekontaminált üledékek kezelését és az MTD eljárásokat 2. fokozatú biológiai biztonsági (Biosafety Level 2) gyakorlat szerint kell végezni⁹.
- g. Csak a mellékelt vagy meghatározott eldobható laboratóriumi felszerelés alkalmazható.
- h. Az RNS amplikonnal szennyezett munkafelületeket, pipettorokat és felszerelést 1:1 arányban hígított háztartási fehérítőszerrel (1 rész fehérítő és 1 rész víz) dekontaminálni kell a TESZTELJÁRÁS című részben leírtak szerint. Tizenöt perc eltelté után a munkafelületet vízzel át kell törölni a fehérítőszer eltávolítása végett.
- i. A teszt elvégzéséhez hidrofób filterrel ellátott hegygel felszerelt pozitív térfogatkiszorításos pipettorokat vagy légkiszorításos pipettorokat kell alkalmazni. A lizátum lízis csőből az amplifikációs csőbe történő transzferéhez hidrofób filterrel ellátott, hosszában megnyújtott hegyeket kell alkalmazni. Minden egyes reakciócsőhöz külön-külön eldobható hegyet kell alkalmazni. A mintát tartalmazó pipettahegyet nem szabad a csővekkal megrakott állvány felett lóbálni. Az elhasznált hegyet azonnal ki kell dobni egy megfelelő, biológiai szennyeződések tartalmazó biztonsági tartályba.
- j. Amennyiben reagens hozzáadására ismétlődő pipettor alkalmazására kerül sor, az egyik csőből a másikra való átvitel esélyének minimalizálása érdekében a lizátum csőbe való pipettázása után véletlenül se érintse meg a csövet a pipetta hegyével. A reagens kifolyatásakor a pipetta hegyét tesztcső belső falának irányítsa a szétfröcskölődés elkerülése végett. Az átviteli kontamináció elkerülése céljából a gondos pipettázás rendkívül fontos.
- k. Az amplifikációt megelőző és az azt követő lépésekhez külön pipettorokat kell alkalmazni.
- l. Miután a reakciócsöveket leolvastatta a luminométerben, a csöveket a TESZTELJÁRÁS és a ELJÁRÁSSAL KAPCSOLATOS MEGJEGYZÉSEK című részben leírtak szerint kontaminálja és helyezze a hulladék közé a laboratóriumi környezet amplikonnal való szennyezésének elkerülése céljából.
- m. A légmentesen záró kártyákat vagy visszapatintható sapkákat a reakciócsövekről való eltávolítás után közvetlenül el kell helyezni a megfelelő, biológiai hulladékokat tartalmazó tartályba. Friss légmentesen záró kártyákat vagy visszapatintható sapkákat kell mindig alkalmazni a keresztkontamináció elkerülésére. Ezeket az anyagokat SOHASEM szabad ismételtelen felhasználni. A légmentesen záró kártyákat gondosan rögzíteni kell a reakciócsövek tetején.
- n. Ne fedje be a vízfürdőt az inkubálás során, különösen a visszapatintható sapkákat alkalmazása esetén. (A fedőn felgyülemelő kondenzátum egy esetleges kontamináció forrása lehet).
- o. A szelekciós reagens (Selection Reagent) hozzáadása után megfelelő vortexelés szükséges a pontos vizsgálati eredmények eléréséhez.
- p. A hibridizációs védővizsgálati (Hybridization Protection Assay (HPA)) lépéshez egy elkülönült terület kijelölése javallott, a vizsgálat során esetleg fellépő amplikon-kontamináció minimalizálása céljából. Ezt a kijelölt területet a minta- és reagens-előkészítési, illetve az amplifikációs területektől el kell különíteni.

- q. A laboratóriumi területek amplikonnal való kontaminálódásának elkerülése céljából, a laboratóriumi területre egyirányú munkafolyamatot kell szervezni. Például, a minta- és reagens-előkészítéstől kiindulva az amplifikációs, majd a HPA területek irányába. Nem szabad mintákat, felszerelést és reagenset visszavinni az előző lépés elvégzésének területére. Továbbá, a személyzet a megfelelő antikonaminációs biztonsági intézkedések nélkül ne mozogjon vissza a megelőző munkaterületekre. Határozottan javallott, hogy a minta-feldolgozásra alkalmazott biológiai biztonsági fülkét ne alkalmazzák az MTD teszt végzésére.

A TESZT ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MAGYARÁZATA

Az MTD teszt transzkripció által közvetített amplifikációt (Transcription-Mediated Amplification (TMA)) és hibridizációs védővizsgálatot (Hybridization Protection Assay (HPA²)) alkalmaz az *M. tuberculosis*-komplex riboszómális ribonukleinsavának (rRNS) minőségi kimutatására. Az MTD teszt a tenyészthető és nem tenyészthető szervezetekből egyaránt képes kimutatni az rRNS-t. Az *M. tuberculosis*-komplexet alkotó szervezetek közé tartozik az *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* és az *M. canetti* (12,13). Az MTD minden szervezetet kimutat az *M. tuberculosis*-komplexen belül. Azonban, az *M. microti* csak az állatokat fertőzi, az *M. bovis* ritkán kerül át fertőzött állatokról emberre, az *M. africanum* pedig a trópusi Afrikában okoz tüdőbetegséget embereken¹². A komplex messze legelterjedtebb tagja az *M. tuberculosis*, amely világszerte felelős az emberi megbetegedésekért. A CDC nemrégiben jelentette, hogy az AIDS-sal kapcsolatos tuberculosis előfordulásában, idegeneredetű esetekben és a magasabb kockázatú csoportba sorolt populációban tapasztalható átfertőzésben növekvő tendenciát tapasztaltak^{6,9}. Hasonlóképpen emelkedik az egy vagy több, tuberculosis elleni gyógyszerekre rezisztens *M. tuberculosis* törzsek száma¹¹. E tények számmottevő közegészségügyi problémával járnak.

A tuberculosis kimutatására szolgáló hagyományos tenyész eljárások már 1 hét alatt is hozhatnak eredményt, de az eljárás akár 8 hétig is eltarthat^{7,10}. Összehasonlításként, az MTD teszt biztosítja az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-ének kimutatását 2,5-3,5 órával a tesztelés megkezdése után. Így, annak ellenére, hogy az MTD teszt nem ad információt a gyógyszerrel szembeni érzékenységről, az *M. tuberculosis* gyors és biztos kimutatását eredményezheti, ami az elkülönítők jobb kihasználtságához, a terápia megfelelőbb elkezdéséhez és a fertőzött kapcsolatok korábbi kimutatásához és elszigeteléséhez vezethet³.

AZ ELJÁRÁS ALAPELVEI

Az MTD teszt két részből álló teszt, amelyben az amplifikálás és kimutatás egyetlen csőben történik. Először, a nukleinsavakat ultrahangos kezeléssel (szonikálással) kiszabadítjuk a mikobakteriális sejtekből. A nukleinsavakat hődenaturációnak vetjük alá és roncsoljuk az rRNS másodlagos szerkezetét. Ezután, az állandó 42°C-on történő Transcription-Mediated Amplification (Transzkripcióval közvetített amplifikáció, TMA) eljárás alkalmazásával specifikus mikobakteriális rRNS célszekvenciát amplifikálunk DNS-intermedierek transzkripciójával, aminek eredményeként a mycobakteriális RNS-amplikon számos másolatához jutunk.

Ezt követően, a Hybridization Protection Assay (Hibridizációs védőesszé, HPA) eljárás alkalmazásával *M. tuberculosis*-komplexre specifikus szekvenciákat mutatunk ki az RNS-amplikonban². A *Mycobacterium tuberculosis* hibridizációs reagens (*Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent*) kemiluminescens jelzéssel ellátott egyszálú DNS-próbát tartalmaz. Ez a próba az *M. tuberculosis*-komplexre specifikus szekvenciákkal komplementer. Amikor a próba és a specifikus szekvenciák között stabil RNS:DNS hibridek alakulnak ki, kisselektáljuk a hibridizált próbát és Leader® luminométerben megmérjük a lumineszcenciát.

REAGENSEK (50 DB. TESZTKÉSZLET)

Az MTD teszthez alábbi reagenseket biztosítjuk:

Megjegyzés: A reagensekkel összefüggésbe hozható figyelmeztető és óvintézkedésre vonatkozó mondatokkal kapcsolatban lásd a Biztonsági adatlap könyvtárat (Safety Data Sheet Library) a www.hologic.com/sds lapon.

A reagens neve	térfogata
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFIKÁCIÓS TÁLCA (MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFICATION TRAY)	
Mycobacterium-minta hígító puffere (<i>Mycobacterium Specimen Dilution Buffer</i> (SDB)) < 3% detergenst tartalmazó, Trissel pufferelt oldat	1 x 2,5 mL
Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens (<i>Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent</i> (A)) 5% térfogatnövelőt tartalmazó, Trissel pufferelt oldatban liofilizált nukleinsavak	1 x 3 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium amplifikációs puffer (<i>Mycobacterium Amplification Buffer</i> (AB)) Tartósítószeret tartalmazó vizes oldat	1 x 3 mL
Mycobacterium olajos reagens (<i>Mycobacterium Oil Reagent</i> (O)) Szilikonolaj	1 x 10 mL
Mycobacterium enzimreagens (<i>Mycobacterium Enzyme Reagent</i> (E)) <10% térfogatnövelő ágenst és ≥15 mM N-acetil-L-ciszteint tartalmazó, HEPES-sel pufferelt oldatban liofilizált reverz transzkriptáz és RNS-polimeráz	1 x 1,5 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium enzimhígító-puffer (<i>Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer</i> (EDB)) Felületaktív anyagot és glicerint tartalmazó, Trissel pufferelt oldat	1 x 1,5 mL
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HIBRIDIZÁCIÓS TÁLCA (MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HYBRIDIZATION TRAY)	
Mycobacterium tuberculosis hibridizációs reagens (<i>Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent</i> (H)) térfogatnövelő ágenst és detergenst tartalmazó, szukcináttal pufferelt oldatban liofilizált, kemiluminescens jelzéssel ellátott, < 100 ng/íola mennyiségű nem fertőző DNS-próba	1 x 6 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium Hibridizációs Puffer (<i>Mycobacterium Hybridization Buffer</i> (HB)) < 4% detergenst tartalmazó, szukcináttal pufferelt oldat	1 x 6 mL
Mycobacterium szelekciós reagens (<i>Mycobacterium Selection Reagent</i> (S)) Felületaktív anyagot tartalmazó, boráttal pufferelt oldat	1 x 15 mL
Mycobacterium Lizáló Csövek (<i>Mycobacterium Lysing Tubes</i> (LT)) Úveggyöngyök, Térfogatnövelő ágens	2 x 25 Cső

TÁROLÁSI ÉS KEZELÉSI ELŐÍRÁSOK

A. Az alábbi folyékony vagy feloldott komponenseket 2°C -8°C-on kell tárolni, és ezek a jelzett lejárati dátumig stabilak maradnak:

- Mycobacterium mintahígító-puffer (SDB)
- Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens (A)
- Mycobacterium amplifikációs puffer (AB)
- Mycobacterium enzimreagens (E)
- Mycobacterium enzimhígító-reagens (EDB)
- Mycobacterium tuberculosis hibridizációs reagens (H)

A feloldott Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens (A) 2°C és 8°C közötti hőmérsékleten tárolva 2 hónapig stabil. A Mycobacterium tuberculosis hibridizációs reagens (H) és a Mycobacterium enzimreagens (E) a feloldás után 2°C -8°C-on 1 hónapig, -20°C-on vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten, lefagyasztott adagokként tárolva az feloldás napjától számított 2 hónapig stabil marad. A lefagyasztott adagokat a kiolvasztás napján fel kell használni. Dérmentes (frost-free) fagyasztót tilos alkalmazni.

B. A készlet alábbi alkotói 2°C -25°C-on való tárolás esetén a feltüntetett lejárati napig stabilak.

- Mycobacterium olajos reagens (O)
- Mycobacterium hibridizációs puffer (HB)
- Mycobacterium szelekciós reagens (S)
- Mycobacterium lizáló csövek (LT)

MINTAGYŰJTÉS, -TÁROLÁS, -SZÁLLÍTÁS ÉS -FELDOLGOZÁS

Mintagyűjtés és -tárolás:

A mintákat steril műanyag tartályokba kell gyűjteni, és szállításig vagy feldolgozásig 2°C -8°C-on kell tárolni. A klinikai vizsgálatba bevett minták a feldolgozás előtt maximum 4 napig (általában 24 óránál rovidebb ideig) voltak tárolva.

Szállítás:

A mintákat a lehető legrövidebb idő alatt a laboratóriumba kell szállítani a vonatkozó szabályok szerint.

Feldolgozás (dekontamináció és töményítés):

Nagy vértartalmú mintákat nem szabad az MTD teszttel vizsgálni. Az MTD teszt a M. tuberculosis-komplex tagjaiból származó rRNS kimutatására lett tervezve a CDC által leírt NALC-NaOH vagy NaOH dekontaminációs protokollok általánosan elfogadott adaptációjával (1%-1,5% NaOH 15-20 percig, majd centrifugálás $\geq 3.000 \times g$) készített üledékek alkalmazásával.

Feldolgozott Üledékek Tárolása:

Az üledékeket a tesztelés előtt maximum 3 napig lehet tárolni 2°C-8°C-on. Az üledékeket -20°C vagy -70°C-on fagyasztva akár 6 hónapig is lehet tárolni. Dérmentes (frost-free) fagyasztókat tilos alkalmazni.

ANYAGOK**A. A készlet képező anyagok**

(*bioMérieux hiv. No. 39006/Hologic Kat. Sz. 301001*)

50 Teszthez

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFIKÁCIÓS TÁLCA

Mycobacterium minta hígító puffere (SDB)	1 x 2,5 mL
Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens (A)	1 x 3 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium amplifikációs puffer (AB)	1 x 3 mL
Mycobacterium olajos reagens (O)	1 x 10 mL
Mycobacterium enzimreagens (E)	1 x 1,5 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium enzimhígító-puffer (EDB)	1 x 1,5 mL

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HIBRIDIZÁCIÓS TÁLCA

Mycobacterium tuberculosis hibridizációs reagens (H)	1 x 6 mL (feloldás esetén)
Mycobacterium hibridizációs puffer (HB)	1 x 6 mL
Mycobacterium szelekciós reagens (S)	1 x 15 mL
Mycobacterium lizáló csövek (LT)	2 x 25 Cső
Légmentessen záró kártyák	1 csomag

B. Szükséges, de a készlet részét nem képező anyagok

- 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, és 450 µL kimérésére alkalmas mikropipetták
- Vortex keverő
- Steril víz (szűrt vagy autoklávozott)
- Tenyésztő csövek
- Steril, 3 mm-es üvegyöngyök
- Csavaros kupakkal ellátott mikrocentrifuga-csővek
- Pozitív kontrol sejtek az Amplifikációhoz (például, M. tuberculosis, ATCC 25177 vagy ATCC 27294)
- Negatív kontrol sejtek az Amplifikációhoz (például, M. gordonae, ATCC 14470, vagy M. terrae, ATCC 15755)
- Háztartási fehérítő (5,25% hipoklorit-oldat)
- Műanyag hátlapos, laboratóriumi felülettakaró
- Hidrofób filterrel ellátott 1000 µL-es pipettahegyek

C. Az Ön Hologic Képviselőtől beszerezhető további anyagok

- Leader 50i Luminométer (bioMérieux hiv. 39400 / Hologic Kat. Sz. 103100i)
- Szonikátor (bioMérieux hiv. 39409 / Hologic Kat. Sz. 901104)
- Kimutatási Reagenskészlet (bioMérieux hiv. 39300 / Hologic Kat. Sz. 201791)
- MTD Amplifikációs Kontrolok (bioMérieux hiv. 39223/Hologic Kat. Sz. 301043F)
- Blokktermosztát^A (42° ± 1°C, 60° ± 1°C, és 95° ± 5°C) (bioMérieux hiv. 39405, 39406, 39407 / Hologic Kat. Sz. 105524, 105524F, 105524J)
- Szonikátorállvány (bioMérieux hiv. 39313 / Hologic Kat. Sz. 104027)
- Tesztcső-tartók (bioMérieux hiv. 39311 / Hologic Kat. Sz. 104769)
- Hidrofób filterrel ellátott, nyújtott hosszúságú pipettacsúcsok (1250 µL) (bioMérieux hiv. 39315 / Hologic Kat. Sz. 104316)
- Polipropilén csövek, 12 x 75 mm (bioMérieux hiv. 39308 / Hologic Kat. Sz. 102440)
- Rápatintható sapkák 12 x 75 mm-es polipropilén csövekhez (bioMérieux hiv. 39320 / Hologic Kat. Sz. 400713)

TESZTELJÁRÁS**Kontrolok**

Az Amplifikációban pozitív kontrol sejtként alkalmazott sejteknek az *M. tuberculosis*-komplexet alkotó sejtek közül kell kikerülnie, azaz lehet például avirulens H37Ra (ATCC 25177) vagy virulens H37Rv (ATCC 27294). Az amplifikációban negatív kontrolnak alkalmazott sejteknek MOTT sejteknek, például *M. goodii* (ATCC 14470) vagy *M. terrae* (ATCC 15755) sejteknek kell lenniük. A kontrolokat a minta tesztelése előtt kell elkészíteni.

50 µL sejtkontrolnak 25-150 CFU-t kell tartalmaznia, azaz vizsgálatonként a végső koncentrációnak 1-10 CFU-nak kell lennie. Ezt a koncentrációt tenyésztéssel kell ellenőrizni. Ezeket a sejtkontrolokat a minta-előkészítéshez szükséges kontrolok elkészítésében alkalmazzuk. (Ld. Mintakészítés).

1. A sejtkontrolok készítésének javasolt módja

- a. Tegyen 3-5 steril 3 mm-es üveggyöngyöt egy tiszta tenyészcsőbe.
- b. Mérjen a csőbe 1-2 mL steril vizet. A megfelelő tenyészetből adjon ehhez néhány oltókacsnyi szaporulatot. Zárja le a csövet és többször vortexelje nagy sebességen.
- c. Hagyja a szuszpenziót 15 percig ülepedni.
- d. Transzferálja a felülúszót egy tiszta tenyészcsőbe. McFarland referencia alkalmazásával állítsa be a turbiditást #1 McFarland zavarosságmérő standarddal egyenlő turbiditásra.
- e. Készítsen a szuszpenzióból 1:100 hígítást úgy, hogy 10 mL steril vízbe bemér 100 µL #1 McFarland szuszpenziót. Zárja le és vortexelje. Ez az 1. hígítás.
- f. Készítsen egy második 1:100 hígítást úgy, hogy 10 mL steril vízbe bemér az 1. hígításból 100 µL-t. Zárja le és vortexelje. Ez a 2. hígítás. Az oldat 50 µL-ének körülbelül 25 - 150 CFU-t kell tartalmaznia.

Sejtkontrolok Szétosztása és Tárolása

- a. A hígításokat tiszta 1,5 mL-es, csavarostetejű mikrocentrifuga-csővekbe, egyszerhasználatos adagokba (500 µL) kell szétosztani és az adagokat -20°C-on 6 hónapig, vagy -70°C-on 1 évig lehet tárolni. Dérmentes (frost-free) fagyasztókat tilos alkalmazni.

A javasolt *M. tuberculosis* pozitív sejtkontrol tesztelése csak a reagensekkel kapcsolatos lényeges problémák monitorozására szolgál. A pozitív kontrol az előkészítésben alkalmazott reagensek, feleslegben jelenlévő NaOH és foszfátpuffer okozta interferenciából eredő, hatásainak monitorozására szolgál. A javasolt sejtkontrolokkal nem lehet kimutatni az eljárásban az amplifikáció hatékonyságát vagy szelekciós idő megfelelését befolyásoló időzítést vagy hőmérsékleteket érintő változásokat. Az útmutatók vagy speciális előírások szerint, további kontrolok is tesztelhetők.

2. Mintagátó Kontrolok

Negatív MTD teszt esetén, illetve ha az orvos határozottan gyanítja, hogy a beteg tuberculosisistól szenved, az alábbi eljárást alkalmazásával lehet tesztelni a minta gátlását:

- a. Tegyen 50-50 µL Mintahígító-puffert 2 *Mycobacterium* líziscsőbe (LT) (oltott és oltatlan).
- b. Adjon 50 µL, Amplifikációban pozitív kontrolnak alkalmazott sejtuszuszpenziót és 450 µL üledéket az 1. csőbe (oltott). Adjon 450 µL üledéket a második csőbe (oltatlan). Végezze el a tesztet a szokásos módon.

Értékelés

Amennyiben az oltott cső RLU-értéke ≥ 30.000 , akkor a minta nem gátolja az amplifikációt és egyértelműen nincs elérhető cél az amplifikációhoz. Amennyiben az "oltott" cső RLU-értéke 30.000 alatt van, a minta gátolja az amplifikációt és egy másik mintát kell értékelni. Amennyiben a "nem oltott" minta megismételt tesztje is pozitív, az MTD teszt eredményét pozitívnak lehet tekinteni. Az ilyen típusú legvalószínűbb oka a véletlenszerű mintagyűjtés változékonysága, azaz az első adag nem tartalmaz amplifikációra alkalmas célszekvenciát, viszont a második adagban van ilyen szekvencia. A "nem oltott" cső RLU értéke egyaránt lehet pozitív és negatív, mivel az üledékadag tartalmaz vagy nem tartalmaz *M. tuberculosis* rRNS-t.

3. Laboratóriumi kontamináció monitoringja

Amplikon vagy *M. tuberculosis* sejtek okozta laboratóriumi kontamináció monitorozására az alábbi eljárást lehet elvégezni:

- a. Tegyen 1 mL steril vizet egy tiszta csőbe. Nedvesítsen be steril vízzel egy poliészter vagy dacron tampont.
- b. Törölje le a tesztelni kívánt munkaasztal egy részét vagy a kérdéses berendezést.
- c. Helyezze a tampont a vízbe és óvatosan keverjük fel. Nyomkodja a tampont a cső egyik oldalához, majd vegye ki. Dobja ki a tampont egy 1:1 arányban hígított háztartási fehérítőt tartalmazó tartályba.

- d. A tamponból kinyomkodott anyagot tartalmazó vízből adjon 25 µL-t egy 50 µL amplifikációs reagenst és 200 µL olajos reagenst tartalmazó amplifikációs Csőbe.
- e. Az amplifikációt és a kimutatást a TESZTELJÁRÁS-ban leírtak szerint végezze.

Értékelés

Amennyiben az eredmény ≥ 30.000 RLU, a felszín kontaminálódott és azt fehérítővel végzett kezeléssel dekontaminálni kell a TESZTELJÁRÁS, Felszerelés előkészítése című részében javasoltak szerint. Amennyiben feltételezhető, hogy a vízfürdő kontaminálódott, vegyen 25 µL mintát a vízfürdőből és azt amplifikálja a tamponból kinyomkodott anyagra vonatkozóan leírtak szerint. Az eljárás csak akkor működik, ha a vízfürdőben nem használtak antimikrobiális ágensek.

A berendezések előkészítése

1. Az ultrahang energiájának optimális továbbítása céljából a szonikátorban lévő vizet az egyes futtatások előtt gondosan gázmentesíteni kell az alábbi eljárás szerint:
 - a. Szobahőmérsékletű csapvízzel tölts fel a szonikátor víztartályát a tartály szélétől mért 1 cm-en belüli magassáig.
 - b. Körülbelül 15 percig működtesse a szonikátort a víz alapos gázmentesítése céljából.
2. Állítsa be az 1 blokktermosztát hőmérsékletét 95°C -ra, az 1. blokktermosztátét vagy vízfürdőjét 60°C -ra és egy másik blokktermosztátét vagy vízfürdőjét pedig $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ -ra.
3. Kezdés előtt törölje le a munkafelületeket, felszerelést és pipettorokat 1:1 arányban hígított háztartási fehérítőszerrel. A fehérítőnek legalább 15 percig érintkeznie kell a felszínnel. A fehérítő eltávolítására a munkafelületeket vízzel át lehet törölni. A teszt elvégzésére biztosított felületet fedje le műanyag hátlapos laboratóriumi fedőpapírral.
4. Készítse elő működtetésre a Leader Luminométert. Győződjön meg arról, hogy van a teszt futtatásához elegendő mennyiségű I-es és II-es kimutatási reagens és győződjön meg arról is, hogy a reagenscsövek meg vannak-e töltve. A kimutatási reagens betöltésére vonatkozó további információért ld. a berendezés kezelési kézikönyvét. (a kimutatási reagenset külön kell beszerezni).

Reagens-előkészítés

A liofilizált, Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagenst (A) tartalmazó fiola (50 tesztre elegendő) tartalmához adjon 3,0 mL Mycobacterium amplifikációs puffert (AB). Vortexelje addig, amíg az oldat össze nem keveredik. A feloldott reagenst inkubálja szobahőmérsékleten kitisztulásig. A feloldott Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens 2°C - 8°C -on 2 hónapig tárolható. Felhasználás előtt várni kell addig, amíg a Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagens szobahőmérsékletre fel nem melegszik.

Minta-előkészítés

1. Lásson el felirattal elegendő számú Mycobacterium líziscsövet (LT) a minták teszteléséhez, egy további csövet az Amplifikációban alkalmazott pozitív vagy negatív kontrolnak, illetve a minta-előkészítésben pozitív vagy negatív kontrolnak. Vegye le és tegye vissza a kupakokat.
2. Pipettázzon 50 µL Mycobacterium mintahígító-puffert (SBD) az összes Mycobacterium líziscsőbe(LT). Kövesse a kontrolokra vonatkozó "A" vagy "B", illetve a mintákra vonatkozó "C" utasításokat.
 - a. Kontrolok a minták feldolgozásához:
Minden kontrolnál, mérjen be 1 mL NALC/NaOH oldatot, a köpet feldolgozására szolgáló foszfátpufferből 3 mL-t és 1 mL steril vizet egy mintafeldolgozó-csőbe.
 - i. Vortexelje össze.
 - ii. A NALC/NaOH/foszfátpuffer oldatból pipettázzon át 450 µL-t a megfelelő jelzéssel ellátott Mycobacterium Líziscsőbe (LT) és adjon ehhez 50 µL sejtkontrol-oldatot.
 - b. Amplifikációs kontrolsejtek alkalmazása esetén, az amplifikációban kontrolként szolgáló sejtek szuszpenzióját tartalmazó tárolóüvegből mérjen át 450 µL szuszpenziót a megfelelő jelzéssel ellátott Mycobacterium líziscsőbe (LT).
 - c. Minta: Transzferáljon 450 µL dekontaminált, jól összekevert mintát a tárolóüvegből a megfelelő jelzéssel ellátott Mycobacterium líziscsőbe (LT).
3. Az egyes minták hozzáadása után pattintsa vissza a kupakot a Mycobacterium líziscsőre (LT).
4. Vortexelje 3 másodpercig.

Mintalízálás

1. Nyomja be a Mycobacterium líziscsöveket (LT) a szonikátor csőtartójába úgy, hogy a cső alján lévő reakciókeverék alámerüljön ugyan, de a kupak a víz felett legyen. Tegye a szonikátor csőtartóját a szonikátorfürdőbe. A CSÖVEK VÉLETLENÜL SEM ÉRINTKEZHETNEK A SZONIKÁTOR ALJÁVAL VAGY OLDALÁVAL.
2. Szonikáljon 15 percnél, de 20 percnél mindenképpen rövidebb ideig. Az így szonikált mintákat és kontrolokat tekintjük "lizátumoknak". TILOS A LIZÁTUMOKAT VORTEXELNI.

Amplifikáció

1. Jelöljön meg néhány amplifikációs csövet (12 x 75 mm-es polipropilén csövek) a Mycobacterium líziscsöveknél (LT) használt kódszámoknak megfelelő számokkal a cső tetejéhez közel. Hasonlóképpen lássa el jelzéssel az amplifikációban pozitív és negatív kontroloknak szánt csöveket. RNS-kontrol alkalmazása esetén lássa el jelzéssel a negatív és pozitív kontroloknak megfelelő amplifikációs csöveket.
2. Ismétlő pipettor alkalmazásával mérjen be 50-50 µL Mycobacterium tuberculosis amplifikációs reagensoldatot az egyes amplifikációs csövek alá. Ismétlő pipettor alkalmazásával adjon 200-200 µL Mycobacterium olajos reagenst (O) az egyes amplifikációs csövekhez.
3. TILOS A LIZÁTUMOKAT VORTEXELNI. Mérjen be 25 µL lizátumot a megfelelő jelzéssel ellátott amplifikációs cső alá úgy, hogy minden egyes transzfer után egy másik nyújtott végű, hidrofób filterrel ellátott pipettahegyet alkalmaz. A fennmaradt lizátum 2°C - 8°C -on akár 7 napig, -20°C vagy az alá fagyasztva pedig maximum 1 hónapig eláll. Dérmentes (frost-free) fagyasztokat tilos alkalmazni. Amennyiben a kérdéses betegről származó mintán további tesztelésre van szükség, a tárolt lizátumot hagyni kell szobahőmérsékletűre felmelegedni. TILOS A LIZÁTUMOT VORTEXELNI.
4. Inkubálja a csöveket blokktermosztátban 95°C -on 15 percig, de 20 percnél ne tovább.
5. Készítse el az enzimkeveréket úgy, hogy a liofilizált Mycobacterium enzimreagenshez (E) hozzámér 1,5 mL Mycobacterium enzimhígító-puffert (EDB). Keverje össze de ne hogy vortexelje. A feloldott enzimreagens adagonként^B tárolva 2°C - 8°C -on

a feloldást követően 1 hónapig, -20°C vagy az alá fagyasztva pedig 2 hónapig stabil marad. Amennyiben a tesztelés fagyasztott adagokkal történik, először hagyni kell az fagyasztott adagot szobahőmérsékletre felmelegedni. Az adagokat nem szabad megemelt hőmérsékleten kiolvasztani. Kiolvasztás után az adagot úgy kell összekeverni, hogy az amplifikációs csőhöz való hozzáadás előtt a keveréket az ismétlődő pipettorral óvatosan szívja fel és nyomja vissza.

6. Tegye a csöveket a $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ -os blokktermosztátba vagy vízfürdőbe, és 5 percig hagyja hűlni. **NE HAGYJA, HOGY A CSÖVEK SZOBAHŐMÉRSÉKLETŰRE LEHÜLJENEK. NE FEDJE LE A VÍZFÜRDŐT.**
7. Ismétlődő pipettorral mérjen be 25-25 μL enzimkeveréket minden egyes, $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ -on tartott amplifikációs csőbe. Rázással keverje össze. Inkubálja a csöveket 42°C -on 30 percig, de 60 percnél semmiképpen se tovább. Az inkubációs lépés alatt szigetelő kártyákat kell alkalmazni, vagy a csövek tetejére vissza kell pattintani a kupákat. **NE FEDJE LE A VÍZFÜRDŐT.**
8. A 30 perces inkubálás után a csöveket le lehet fedni és 2°C - 8°C -on maximum 2 órán át, -20°C -on 12 órán át lehet lehet tárolni. Amennyiben a csövek -20°C -on 12 órán át lettek tárolva, a hibridizációs lépés után hagyni kell, hogy a csövek tartalma szobahőmérsékleten vagy 60°C -nál nem magasabb hőmérsékleten teljesen felolvadjon. 12 órán át való tárolás esetén a szigetelő kártyák helyett inkább a lepatintható sapkákat kell alkalmazni.

Hibridizáció

1. Oldja fel a liofilizált Mycobacterium tuberculosis hibridizációs reagenst (H) 6 mL Mycobacterium hibridizációs pufferben (HB). A feloldás előtt a Tuberculosis hibridizációs reagensnek (H) és a Mycobacterium hibridizációs puffernek (HB) szobahőmérsékletűnek kell lennie. Amennyiben a Mycobacterium hibridizációs puffert (HB) előzőleg lefagyasztotta, enyhe kevergetés mellett 60°C -on olvassa ki. Győződjön meg arról, hogy az összes komponens feloldódott-e. Vortexelje az oldatot addig, amíg az ki nem tisztul (ez akár 1 percig is eltarthat). Ez mutatja azt, hogy minden összetevő feloldódott. A feloldott hibridizációs reagens adagonként^c tárolva 2°C - 8°C -on a feloldást követően 1 hónapig, -20°C vagy az alá fagyasztva pedig 2 hónapig stabil marad. Amennyiben a hibridizációs reagenst előzőleg lehűtötte vagy lefagyasztotta, enyhe kevergetés mellett 60°C -on olvassa ki. Győződjön meg arról, hogy az összes komponens feloldódott-e.
2. Az egyes csövekbe mérjen be 100-100 μL oldott hibridizációs reagenst az ismétlődő pipettor alkalmazásával. Fedje le a csöveket szigetelőkárttyával vagy lepatintható kupakkal. A csöveket maximális sebességgel vortexelje háromszor, esetenként **legalább** egy teljes másodpercig^d. A reakciócső(vek)ben a megfelelő keveredés úgy lehet elérni, hogy a vortexelés alatt a csöveket függőlegesen kell tartani és hagyni kell, hogy a reakciókeverék elérje a csőfal felső felét. (A lehetséges kontamináció elkerülése végett ne hagyja, hogy a reakciókeverék érintkezzen a szigetelőkárttyával vagy kupakkal. Megfelelő vortexelés után, a reakciókeveréknek egységes sárga színűnek kell lennie.
3. Inkubálja a csöveket blokktermosztátban vagy vízfürdőben 60°C -on 15 percig, de 20 percnél ne tovább.

Szelekció

1. A teszt kezdete előtt a Mycobacterium szelekciós reagensnek (S) szobahőmérsékletűnek kell lennie. Vegye ki a csöveket a 60°C -os vízfürdőből vagy blokktermosztátból, és ismétlődő pipettorral mérjen be 300 μL Mycobacterium szelekciós reagenst (S). Fedje le a csöveket szigetelőkárttyával vagy lepatintható kupakkal. A csöveket közepes sebességgel vortexelje háromszor, esetenként **legalább** egy teljes másodpercig^d. A reakciócső(vek)ben a megfelelő keveredés úgy lehet elérni, hogy a vortexelés alatt a csöveket fejjel lefelé kell tartani és hagyni kell, hogy a reakciókeverék elérje a csőfal felső felét. (A lehetséges kontamináció elkerülése végett ne hagyja, hogy a reakciókeverék érintkezzen a szigetelőkárttyával vagy kupakkal. Megfelelő vortexelés után, a reakciókeveréknek egységes rózsaszínűnek színűnek kell lennie.
2. Inkubálja a csöveket blokktermosztátban vagy vízfürdőben 60°C -on 15 percig, de 16 percnél ne tovább.
3. Vegye ki a csöveket a vízfürdőből vagy blokktermosztátból. Hűtse a csöveket szobahőmérsékleten legalább 5 percig, de 1 óránál ne tovább. Közvetlenül a kimutatás előtt vegye le a szigetelőkárttyákat vagy kupákat.

Kimutatás

1. A luminométer szoftverének menüjéből válassza ki a megfelelő protokolt. Használjon 2 perces leolvasási időt.
2. Nedves papírzsebkendővel vagy foszlásmentes papírtörülközővel töröljön le minden csövet azért, hogy a cső külső részén ne legyen semmilyen maradvány, és illessze a csövet a luminométerbe a berendezéshez adott utasítások szerint. A csöveket a 3. szelekciós lépés 1 óráján belül le kell olvasni.
3. Az analízis végén vegye ki a csöve(ke)t a luminométerből.
4. Leolvasás után, spriccflasskából óvatosan töltsen tele a reakciócsöveket 1:9 arányban hígított háztartási fehérítővel. Várjon minimum egy órát mielőtt kiöntené a folyadékot a csövekből. Ez segít megelőzni, hogy a laboratóriumi környezet amplitkonál kontaminálódjon.
5. A tesztcsőtartókat, így a mintákra és a tesztekre használt tartókat, a dekontamináláshoz minimum 15 percre teljesen el kell meríteni vízzel 1:1 arányban hígított háztartási fehérítőben. Ezután a fehérítőt vízzel le kell öblíteni és az állványokat szárazra kell törölni vagy hagyni kell a levegőn megszáradni.
6. Ne felejtse el 1:1 arányban hígított háztartási fehérítővel dekontaminálni a laboratóriumi felületeket és a felszerelést.

Tesztisméltés

1. Amennyiben a kérdéses betegről származó minta lizátumán további tesztelésre van szükség, az előkészített lizátumot hagyni kell szobahőmérsékletűre felmelegedni. **TILOS A LIZÁTUMOT VORTEXELNI.**
2. Kövesse a TESZTELJÁRÁS prokolját az amplifikációs lépéstől kezdve.

AZ ELJÁRÁSSAL KAPCSOLATOS MEGJEGYZÉSEK

A. Reagensek

1. Az enzimreagenst feloldás után nem szabad 15 percnél tovább szobahőmérsékleten tartani.
2. Mycobacterium hibridizációs puffer (HB) kicsapódhat. A Mycobacterium hibridizációs puffer (HB) vagy a feloldott hibridizációs reagens 60°C -ra való felmelegítésével és keverésével a csapadék feloldható.

B. Hőmérséklet

1. Az amplifikációs, hibridizációs és szelekciós reakciók függenek a hőmérséklettől; győződjön meg arról, hogy a vízfürdő vagy blokktermosztát hőmérséklete a meghatározott hőmérsékleti tartományba esik.
2. Az amplifikáció optimális teljesítményéhez a csöveket az enzimkeverék hozzáadása előtt 5 percre le kell hűteni 42°C -ra.
3. Az hőmérséklet kritikus fontosságú az amplifikációhoz ($42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

C. Idő

Rendkívül fontos, hogy betartsa a TESZTELJÁRÁS-ban meghatározott időkereteket.

D. Vízfürdő

1. A vízfürdőben a víz szintjét olyan magasan kell tartani, hogy a reakciócsövekben lévő folyékony reagensek szintje teljesen víz alatt legyen, viszont a vízszint nem lehet olyan magas, hogy víz kerülhessen a csövekbe.
2. Az amplifikációs lépés során, a vízfürdőt nem szabad lefedni, mivel a fedőn képződött kondenzátum be- vagy rácspeghet a csövekre.

E. Vortexelés

A hibridizációs és szelekciós lépések során fontos, hogy a keverékek homogének legyenek, különösen az oldott *Mycobacterium tuberculosis* hibridizációs reagens (H) (a reakciókeverék egységesen sárga színű) és a *Mycobacterium* szelekciós reagens hozzáadása után (a reakciókeverék egységesen rózsaszínű).

A vortexeléssel egy adott oldatból egységes szuszpenziót állítható elő. Ha a reagenseket egy tesztsőbe helyezzük és a csövet egy bizonyos külső energiaforrással látjuk el, az oldat gyors rotációba kezd a cső tengelye mentén. E gyors rotáció egységes tesztsuszpenziót eredményez. A megfelelő vortexelés eléréséhez, vortexelés során a csövet egyenesen, függőleges állásban kell tartani és a cső végét meg kell támasztani. Amikor elérte a megfelelő vortexelő mozgást, a szuszpenzió olyan erősségű körkörös mozgással rotál, hogy a mozgás a cső felső felének magasságáig képes megemlíni az oldatot. A hibridizációs és szelekciós lépések során, ezt manipulációt egymás után háromszor alkalmazzuk és a vortexet minden egyes esetben legalább 1 teljes másodpercig tartjuk fenn.

TESZTÉRTÉKELÉS

A *Mycobacterium tuberculosis* amplifikálásán alapuló közvetlen (MTD) teszttel vizsgált minták során kapott eredmények értékelése egy első negatív eredményen (< 30.000 RLU), első pozitív eredményen (≥500.000 RLU), vagy első, nem egyértelmű eredményen (30.000 - 499.999 RLU) alapul. Az MTD tesztet meg kell ismételni az eredeti félretett lizátumból, ha az első eredmény nem egyértelmű. A lizátummal végzett megismételt vizsgálat eredménye > 30.000 RLU esetében tekinthető pozitívnak.

A. Minőségellenőrzési eredmények és elfogadhatóság

A kontrollokkal az alábbi értékeket kell kapni:

- Amplifikációban negatív kontrolnak alkalmazott sejtek: < 20.000 RLU
- Amplifikációban pozitív kontrolnak alkalmazott sejtek: ≥ 500.000 RLU
- A mintafeldolgozás negatív kontrolja: < 20.000 RLU
- A mintafeldolgozás pozitív kontrolja: ≥ 1.000.000 RLU

Tilos a beteg teszteredményeit jelentésbe foglalni, ha az MTD teszt eredményei nem felelnek meg a fenti kritériumoknak. További információk a HIBAELHÁRÍTÁS című részben találhatóak.

Minden egyes adag elkészített kontrollal kapott teszteredmények alapján célértékeket kell meghatározni a kontrolokra minden laboratóriumban.

B. A betegekkel kapott teszteredmények

Amennyiben a kontrolok nem adják az elvárt eredményt, a betegtől gyűjtött mintáról a kontrolokkal azonos futtatásban kapott teszteredményeket tilos a jelentésbe foglalni.

Eredmények:

- ≥ 500.000 RLU az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-ére pozitív
- < 30.000 RLU az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-ére negatív
- 30.000 és 499.999 közötti RLU esetén az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-ére feltehetően pozitív; az eredmények ellenőrzésére a tesztet meg kell ismételni:
Ismétlés ≥ 30.000 RLU az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-re pozitív
Ismétlés < 30.000 RLU az *M. tuberculosis*-komplex rRNS-ére negatív

AZ EREDMÉNYEK JELENTÉSBE FOGLALÁSA

Az MTD tesztből származó eredményeket az orvos rendelkezésére álló más laboratóriumi és klinikai adatokkal együtt kell jelenteni. A klinikai feltételezés fokán alapulva, további minta tesztelését is fegyelembbe kell venni.

Amennyiben az első MTD eredmény pozitív (≥ 500.000 RLU), vagy a megismételt MTD teszt eredménye pozitív (≥ 30.000 RLU), az alábbiak szerepeljenek a jelentésben:

Jelentés:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -komplex rRNS-e kimutatva. AFB kenet (pozitív vagy negatív).
További információk:	AFB tenyészet folyamatban. A minta tartalmazhat MOTT-ot és <i>M. tuberculosis</i> -t, vagy csak <i>M. tuberculosis</i> -t. A <i>tuberculosis</i> diagnózisa nem alapulhat kizárólag ezen a teszten. A kenetre negatív betegre vonatkozó pozitív előrejelzett érték alacsonyabb, mint egy kenetre pozitív betegé. Ez különösen fontos az olyan tesztpopuláció esetén, ahol a <i>tuberculosis</i> előfordulása alacsony és a diagnosztikai eljárások pozitív előrejelzési értékei ennek megfelelően csökkentek.

Amennyiben az első vagy a megismételt MTD teszt eredménye negatív (<30.000 RLU), a jelentésben az alábbiak szerepeljenek:

Jelentés:	Mycobacterium tuberculosis-komplex rRNS-e nincs kimutatva. AFB kenet (pozitív vagy negatív).
További információk:	Mycobacterium tuberculosis-komplex rRNS-e nincs kimutatva. AFB tenyésztet folyamatban. A minta tartalmazhat M. tuberculosis-t, az eredmény esetleg tévesen negatív a MOTT jelenlétében vagy hiányában alacsony számú M. tuberculosis miatt, vagy az eredmény tévesen negatív a mintában lévő és a vizsgálatot zavaró inhibitorok miatt. Amennyiben klinikailag felmerül a tuberculosis gyanuja vagy az inhibitorok jelenléte a mintában, a betegtől származó további minta tesztelését javasoljuk.

KORLÁTOZÁSOK

Csak az M. tuberculosis complex tagjainak kimutatására lehet alkalmazni a CDC által javasolt NALC-NaOH vagy NaOH eljárások követésével előkészített üledékek alkalmazásával. Ezt a tesztet csak (indukált vagy felköhögött) köpetből, tracheális aspirátumokból vagy bronchiális mintákból (például, bronchoalveolaris nedvek vagy bronchiális aspirátumok) készített üledékekkel lehet alkalmazni.

Az MTD teszt ugyan specifikus, de nem tud különbséget tenni az M. tuberculosis-komplex tagjai, azaz az M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum, M. microti és M. canetti, között, és az M. terrae-szerű szervezetek keresztreakciót adnak, ha mintánként 30 CFU-nál magasabb koncentrációkban vannak jelen. Azonban, az M. celatum- és M. terrae-szerű szervezetek klinikai izolátumokban csak ritkán vannak jelen.

A teszteredményeket befolyásolhatja a mintagyűjtés és -szállítás, az eltérő mintagyűjtés, a laboratóriumi feldolgozás során bekövetkező hibák, a téves mintaazonosítás, és a transzkripció hibái. Egy negatív teszt még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a mintából az M. tuberculosis-komplexbe tartozó szervezetet lehessen izolálni.

VÁRT ÉRTÉKEK

A. A kontrol értékek klinikai vizsgálatokban megfigyelt tartománya

Egy 7 helyen végzett klinikai vizsgálatban a kontrolok RLU tartománya az alábbiak adódott:

RLU (N=704)		
	Tartomány	Átlag
Amplifikációban pozitív kontrolsejtek	556.245-től >2.000.000-ig	>2.000.000
Amplifikációban negatív kontrolsejtek	904-től 18.754-ig	3.041

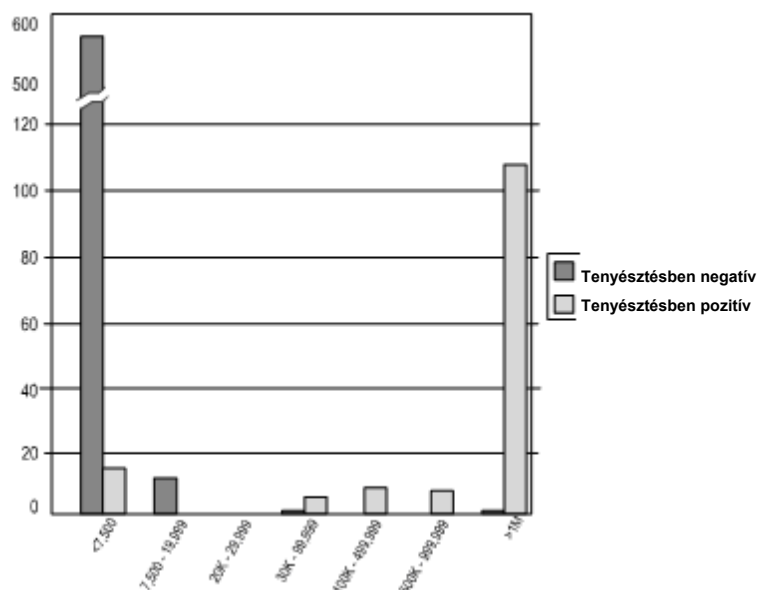
B. Klinikai minták RLU értéktartománya

A 127, MTD tesztre pozitív minta RLU-értékeinek tartománya 35.777 és >2.000.000 RLU közé esett.

Az 577, MTD tesztre negatív minta RLU-értékeinek tartománya 573 és 19.176 RLU közé esett

Az e minták RLU értékeinek, diszkrepancia felbontás utáni gyakoriság-eloszlását az alábbi grafikon ábrázolja: A diszkrepancia-felbontás az ugyanattól a betegtől származó más, tenyésztésre pozitív minták meglétén és/vagy a kezelőorvos végső diagnózisán alapul.

Kezeletlen mintákból származó eredmények eloszlása (7 hely)
N=704



M. tuberculosis-ra negatív	554	10	0	1	0	0	1
M. tuberculosis-ra pozitív	13	0	0	4	7	6	108

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK**A. Klinikai értékelés**

Az eredeti MTD tesztet 6 helyen végzett vizsgálatban értékelték 2.609 betegtől vett 6.079 minta esetén az AFB kenetek eredményeinek és a mycobacteriális tenyészetek eredményeinek összevetésével. Ezek közül 4.000 mintát gyűjtöttek 1.898, tuberculosis elleni terápiában nem részesülő betegtől. A 6 vizsgálati helyeti különféle földrajzi területekről választották. Ezek közül 5, nagy, tuberculosis kezelő központtal ellátott, világvárosi kórházi központ, a hatodik vizsgálati hely pedig egy megyei közegészségügyi laboratórium volt.

Az MTD teszt jelenlegi formáját egy másik, 7 helyen végzett vizsgálatban értékelték az MTD teszt eredményeinek és a mycobacteriális tenyésztés eredményeinek összehasonlításával. A 7, különféle földrajzi területekről választott vizsgálati hely közül 6 hely nagy, tuberculosis kezelő központtal ellátott, világvárosi kórházi központ, a hetedik vizsgálati hely pedig szintén egy nemzeti mycobacteriális laboratórium volt.

A hetedik hely egy megyei közegészségügyi laboratórium volt. Terápiában nem részesülő betegetől származó mintákat vizsgáltak. Ezek közül 132 volt tenyésztésre pozitív az M. tuberculosis-komplexre nézve. E tenyésztésre pozitív mintákból az MTD 119-et kimutatott; 7 minta az M. tuberculosis mellett MOTT-tá alakult.

KEZETLEN BETEGEKTŐL SZÁRMAZÓ MINTÁK

MTD vs. tenyésztés (N=704)

BETEGEK SZERINT		BETEGEK SZERINT	
A a felbontási tenyésztés előtt		A a felbontási tenyésztés után	
	+	-	
MTD	54	4	56
	4	221	4

MINTÁK SZERINT		MINTÁK SZERINT	
A a felbontási tenyésztés előtt		A a felbontási tenyésztés UTÁN	
	+	-	
MTD	119	8	125
	13	564	13

Ebben a vizsgálatban aktív tüdőtuberculosis-gyanús, de kezelésben nem részesülő betegek vettek részt. A tenyésztésre pozitív M. tuberculosisos betegek átlagos előfordulása 20,5% volt.

A tenyésztésben kapott eredményekkel összehasonlítva, a betegeken az MTD teszt általános érzékenysége 93,3%-os, specificitása pedig 99,1%-os volt. A tenyésztésben kapott eredményekkel összehasonlítva, a minták esetében az MTD teszt általános érzékenysége 90,6%-os, specificitása pedig 99,6%-os volt. A 7 helyről származó, érzékenységi- és specificitási értékeket, pozitív előrejelzési értéket (Positive Predictive Value (PPV)) és negatív előrejelzési értéket (Negative Predictive Value (NPV)) az alábbi táblázat tartalmazza. A táblázatban a teljesítmény becslésekre vonatkozó 95%-os konfidencia-intervallumokat is feltüntettük. A diszkrépancia-felbontást követő minden bemutatott adat ugyanattól a betegtől származó más, tenyésztésre pozitív minták meglétén és/vagy a kezelőorvos végső diagnózisán alapul.

Betegek szerint:

	Teljes százalék	Szám vs. összes szám	95% konfidencia intervallum
Érzékenység	93,3%	56/60	83,8-92,2%
Specificitás	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%

Minták szerint:

	Teljes százalék	Szám vs. összes szám	95% konfidencia intervallum
Érzékenység	90,6%	125/138	84,4-94,9%
Specificitás	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%

Az M. tuberculosis-komplexre tenyésztésben és MTD tesztben negatív 564 minta közül, 114 minta tenyésztésben MOTT-ot képzett, 64 származott más tenyészetekben MOTT-ra pozitív betegtől, és 169 pedig mycobacteriális tenyészetekben negatívnak bizonyult betegtől.

B. Pontossági vizsgálatok

2 negatív mintából, 2 gyengén pozitív mintából (^a 100 CFU/teszt) és közepesen magas pozitívítású mintából (^a 1000 CFU/teszt) álló pontossági panelt tesztelésére került sor 3 helyen. A pozitív mintákat úgy készítettük, hogy ismert mennyiségű M. tuberculosis-sal közepesen gátoló üledéket fertőztünk. A mintákat a 3 vizsgálati helyen háromszoros ismétlésben, 3 napon át naponta kétszer teszteltük. Minden futtatásban volt pozitív és negatív amplifikációs kontrol.

Miután nem találtunk jelentős variabilitást a vizsgálati helyek vagy napok között, ezért kombináltuk a három helyről származó adatokat (ld. alább). Mivel a mért RLU értékeket korlátozza a luminométer fotonszorzó-csőve, ezért a 2.000.000 RLU-nál nagyobb értékeket levágtuk. Standard eltérés vagy %-os CV értékek nincsenek megadva.

Pontossági vizsgálatok

	Megfigyelések száma	% Korrekt	Tartomány (RLU)	Átlag (RLU)
1. minta erősen pozitív	108	100%	154.103- >2.000.000	>2.000.000
2. minta gyengén pozitív	108	99,1%	16.324->2.000.000	>2.000.000
3. minta negatív	108	100%	2.004-5.693	2.689
Pozitív sejtkontrol	54	100%	>2.000.000	>2.000.000
Negatív sejtkontrol	54	100%	2.272-4.241	2.944

*egy megfigyelés negatív volt

C. Megismételhetőség

A megismételhetőségi panel 25 mintából és mintánként egy-egy, amplifikációra negatív kontrolból, azaz összesen 50 mintából állt. A megismételhetőségi panelt 4 helyen teszteltük. Összeségében, minden negatív minta (120/120) a várt eredményt hozta, és a pozitív minták 98,8%-a (79/80) is hozta a várt eredményt.

D. Analitikai Specifitás

Az MTD teszt specifitását baktériumokon, gombákon és vírusokon vizsgáltuk. Baktériumok és gombák esetében, a specifitási tesztben 160, a mycobacteriumokkal közeli rokonságban álló törzs (151 faj 62 génuszból), légzőszervi megbetegedést okozó más szervezetek, és a légzőszerv normális flóráját alkotó szervezetek, illetve a törzsfajlás keresztmetszetét adó szervezetek szerepeltek. Típus-törzsekhez az American Type Culture Collection (ATCC) gyűjteményből, 5 izolátumhoz pedig klinikai laboratóriumokból jutottunk. Aktívan szaporodó tenyészetekből készített lizátumokat (vagy 3 esetben rRNS-t) értékeltünk az MTD tesztben a TESZTELJÁRÁS-ban leírtak szerint. Reakciónként körülbelül 5×10^7 CFU-t teszteltünk. Az *M. celatum* és *M. terrae*-szerű törzsek kivételével, csak az *M. tuberculosis*-komplex törzsei adtak pozitív eredményt.

Tesztenként 30 CFU-nál magasabb koncentrációban az *M. celatum* and néhány *M. terrae*-szerű törzs pozitív MTD teszteredményeket ad. Tesztenként 30 CFU-szint esetén, az *M. celatum* 26.772 RLU az *M. terrae*-szerű organizmusok pedig 19.470 és 49.976 közötti RLU értéket eredményeztek.

E. Kimutatási határérték

A világ különböző helyeiről származó, harminc (30) *M. tuberculosis* törzset - így reprezentatív gyógyszerrezisztens- és gyógyszerre érzékeny törzset - mutattunk ki az MTD tesztel. Az MTD mind a 30 törzsnél tesztenként 1 CFU-t már képes volt kimutatni.

F. Visszanyerés

Huszonöt (25) fg *Mycobacterium tuberculosis* rRNS-t (ami tesztenként 5 CFU-val egyenértékű) teszteltünk az alábbi releváns, nem célzott organizmusok jelenlétében (tesztenként körülbelül 540.000 CFU (450 µL)): *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*, és *Rhodococcus bronchialis*. A fenti, nem célzott organizmusok jelenlétében, mindegyik teszt az *M. tuberculosis* rRNS-re pozitív volt.

HIBAELHÁRÍTÁS**MEGFIGYELÉS**

Az amplifikációban alkalmazott negatív sejtkontrol vagy a mintafeldolgozásban alkalmazott negatív kontrol értéke túl magas (≥ 20.000 RLU)

Az amplifikációban alkalmazott pozitív sejtkontrol vagy a mintafeldolgozásban alkalmazott pozitív kontrol értéke alacsony (< 500.000 RLU)

LEHETSÉGES OKOK

- Elégtelen keverés vagy a Mycobacterium szelekciós reagens (S) hozzáadása után nem elegendő mennyiség lett hozzáadva
- Nem megfelelő mértékű gondosság a reakció összeállítása során és a kontamináló anyag amplifikálása során kapott termékek lettek felhasználva.
- Az 5 perces lehúzási lépés kimaradt.
- Kontaminálódott laboratóriumi felületek vagy reagensok.
- A csövek nem lettek megfelelően megtörtölve a luminométerben történő leolvasás előtt.
- Az amplifikációs lépés az ajánlott hőmérséklettartománytól eltérő hőmérsékleten történt.
- Az amplifikációs reagens nem a csőaljára, hanem az oldalára volt pipettázva.
- Elégtelen keverés a feloldott Mycobacterium Tuberculosis hibridizációs reagens hozzáadása után.
- Túl sok szelekciós reagens lett hozzáadva.
- A szelekciós lépés időtartama meghaladta a javasolt időtartományt.
- A 95°C-os inkubálás után a csövek 42°C alá hűltek le.
- A kimutatási reagens csővezetéke eldugult.

JAVASOLT TEENDŐK

Tökéletes keverésre van szükség. Győződjön meg arról, hogy helyes mennyiséget adott hozzá. Vizuálisan ellenőrizze, hogy vortexelés után a keverék egységesen rózsaszínű-e.

A pipettázásra különösen oda kell figyelni. A használt reakciócsöveket 1:9 arányban hígított háztartási fehérítőszerrel dekontaminálni kell a TESZTELJÁRÁS című részben leírtak szerint. A laboratóriumi munkafelületeket, blokktermosztátot, vízfürdőket és pipettorokat 1:1 arányban hígított háztartási fehérítőszerrel dekontaminálni kell a TESZTELJÁRÁS című részben leírtak szerint.

Nedves papírzsebkendővel vagy foszlasmentes papírtörülközővel le kell törölni a csöveket a luminométerben történő leolvasás előtt.

Ellenőrizze a vízfürdő és/vagy blokktermosztát hőmérsékletét és ha szükséges, állítsa be az eljárásban specifikált hőmérséklettartomány elérésére.

Figyelmesen vortexeljen a megadottak szerint (Ld. Hibridizáció, 2. lépés) Vizuálisan ellenőrizze, hogy a vortexelés után az oldat sárga színű-e.

Ellenőrizze a pipettor térfogat-beállítását.

Figyeljen oda arra, hogy a szelekciós lépésben a 60°C-os inkubáció 15 perces legyen.

Transzferálja a csöveket a 95°C-os blokktermosztátból közvetlenül a 42°C-os vízfürdőbe / blokktermosztátba.

Végezzen melegvizet öblítést a berendezés működési kézikönyvében leírtak szerint.

MEGJEGYZÉSEK

- A fűtőblokkokban olyan méretű lyukaknak kell lennie, amelyekbe a 12 x 75 mm-es csövek pontosan beleillenek. A blokktermosztát alkalmazása javallott.
- A lefagyasztott adagok tárolására a csavaros tetejű mikrocentrifuga-csőveket javasoljuk. Egyedileg lefagyasztott adag az alkalmazáshoz csak egyszer fagyasztható le és olvasztható ki. Dérmentes (frost-free) fagyasztót tilos alkalmazni.
- A fagyasztott adagok tárolására az 5 mL-es kriofiolák alkalmazása javallott. Egyedileg lefagyasztott adag az alkalmazáshoz csak egyszer fagyasztható le és olvasztható ki. Dérmentes (frost-free) fagyasztót tilos alkalmazni.
- A vortex-berendezések közötti különbségek és az eltérő sebesség-beállítások miatt, az aktuális vortex-berendezéstől függően hosszabb ideig tartó vortexelésre lehet szükség. A vortexer sebességének beállításánál kövesse a vortex "ELJÁRÁSI MEGJEGYZÉSEK", "E" részében leírt kezelését. Vortexelés során a reakciókeveréknek el kell érnie a cső felső felének magasságát és azon belül is kell maradnia. A pontos vizsgálati eredmények eléréséhez a leírtaknak megfelelő vortexelésre van szükség. A vortexelés ideje összesen maximum 15 másodpercig növelhető a vizsgálati eredményeinek befolyásolása nélkül.

Irodalom

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 acridinium 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., G r me 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., Garrig  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

 gyf lszolg lat: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Technikai segítség: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

A további elérhetőségeket lásd a www.hologic.com honlapon.

A Hologic, Amplified MTD, és a Leader a Hologic, Inc. vállalatnak és/vagy fiók vállalatának a védjegyei, illetve bejegyzett védjegyei az Egyesült Államokban és/vagy más országokban.

Ezt a terméket egy vagy több, a www.hologic.com/patents címen felsorolt Egyesült Államok-beli szabadalom védheti.



Hologic N.V.

Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

 1995–2018 Hologic, Inc. Minden jog fenntartva.
AW-12601-2801 Rev. 003 (HU)
2018-03