

# AMPLIFIKACJA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TEST BEZPOŚREDNI

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO (Opakowanie 50 Testów)  
(bioMerieux ref. 39006 / Hologic Cat. No. 301001)

## ZASTOSOWANIE

Test Hologic Bezpośredniej Amplifikacji Mycobacterium Tuberculosis (MTD) służy do diagnostycznego wykrywania *in vitro* przy użyciu sondy genetycznej zamplifikowanych fragmentów rRNA *Mycobacterium tuberculosis* complex w osadach uzyskanych z płwociny (indukowanej lub odkrztuszonej), aspiratach oskrzelowych (n.p., popłuczynach pęcherzykowo-oskrzelowych, popłuczynach oskrzelowych) lub aspiratach tchawiczych.

## OSTRZEŻENIA

Nie wykazano skuteczności tego testu do bezpośredniego wykrywania rRNA *M. tuberculosis* z innych materiałów klinicznych (np. z krwi, moczu lub stolca). Nie należy wykonywać testu MTD z próbkami osadów opracowanymi niezgodnie z zaleconą procedurą lub przechowywanymi przez inny okres czasu lub w innej temperaturze aniżeli przewiduje to załączona do testu instrukcja.

Z pozytywnych osadów muszą być zakładane hodowle w celu stwierdzenia, czy znajduje się w nich *Mycobacterium* inne niż z kompleksu tuberculosis (MOTT), które może być obecne jako dodatek do *M. tuberculosis* complex oraz w celu wykonania testu lekowrażliwości. Ponadto hodowla AFB powinna być prowadzona w celu określenia jaki znaleziono podgatunek *M. tuberculosis* complex (np. *M. bovis*).

Wprawdzie podczas badań klinicznych były wykonywane badania próbek pobranych od dzieci, pacjentów HIV pozytywnych oraz pacjentów z infekcją MOTT, to jednak ogólna ich liczba była niewystarczająca do wyciągnięcia ostatecznego wniosku dotyczącego występowania różnic statystycznych w tych specyficznych populacjach pacjentów.

Test MTD nie był badany pod względem przydatności diagnostycznej do oceny próbek pochodzących od pacjentów w trakcie leczenia tuberkulostatykami dla określenia ich skuteczności, ani do monitorowania wyników leczenia w trakcie terapii.

Próbki, które są mocno skrwawione nie powinny być badane testem MTD.

## ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- A. Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- B. Test MTD jest specyficzny dla *M. tuberculosis* complex, jednak nie różnicuje jego przedstawicieli na: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* i *M. canetti* (13). *M. celatum* i *M. terrae*-like będą dawały bezpośrednią reakcję jeżeli ich koncentracja będzie większa aniżeli 30 aktywnych jednostek (CFU) przypadających na test. Jednakże, *M. celatum* i *M. terrae*-like są rzadko izolowane z przypadków klinicznych.
- C. Negatywny wynik testu nie wyklucza możliwości izolowania *M. tuberculosis* complex z badanej próbki. Na wyniki testu może mieć wpływ sposób przechowywania próbek, transport, zmienność w pobieraniu próbek, błędy w procedurze laboratoryjnej, zamiana próbek oraz błędy w zapisywaniu.
- D. Test należy używać jedynie do wykrywania *M. tuberculosis* complex w osadach opracowywanych przy pomocy NALC- NaOH lub NaOH zgodnie z procedurą zalecaną przez Centers for Disease Control (CDC)<sup>7</sup>. Ten test może być stosowany jedynie do badania skoncentrowanego osadu płwociny (indukowanej lub odkrztuszonej), aspiratów tchawiczych lub aspiratów oskrzelowych (np. popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, lub aspiratów oskrzelowych). Musi być zachowana ostrożność przy rozcieńczaniu osadu w buforze fosforanowym, dla zapewnienia stężenia fosforanu 67 mM<sup>7</sup>.
- E. Należy unikać kontaktu Odczynników do Detekcji I i II ze skórą, oczami, i błonami śluzowymi. Obficie zmyć wodą miejsce zetknięcia z odczynnikami, jeżeli takie miało miejsce. Jeżeli odczynniki rozlały się, rozcieńczyć je wodą przed osuszeniem powierzchni.
- F. Należy używać ogólnie stosowanych środków ostrożności w trakcie wykonywania testu<sup>4</sup>. Przygotowywanie upłynnienia i dekontaminacji osadu oraz procedura MTD powinny być wykonywane w pomieszczeniach zapewniających 2 stopień bezpieczeństwa biologicznego<sup>5</sup>.
- G. Należy używać wyłącznie jednorazowego sprzętu dostarczonego lub przeznaczonego do celów laboratoryjnych.
- H. Powierzchnie przeznaczone do pracy, pipety i wyposażenie muszą być poddane dekontaminacji z amplikou RNA podchlorynem wapnia rozcieńczonym 1:1 wodą, pomieszczenia należy przemyć wodą wapienną (1 część podchlorynu wapnia i 1 część wody) tak

jak to opisano w PROCEDURZE TESTU. Powierzchnie do pracy muszą być przetarte wodą po 15 min. od usunięcia podchlorynu wapnia.

- I. Do wykonania testu muszą być używane pipety zaopatrzone w końcówki z hydrofobowymi filtrami. W trakcie przenoszenia lizatu z Probówki do Lizy do Probówki do Amplifikacji muszą być używane wydłużone końcówki z hydrofobowymi filtrami. Do każdej probówki w trakcie wykonywania badań należy używać oddzielnej jednorazowej końcówki. Należy unikać wymachiwania pipetą z końcówką napełnioną próbką nad statywem z probówkami. Zużyte końcówki należy natychmiast usunąć do pojemnika na odpadki odpowiednio zabezpieczonego przed możliwością wywołania skażenia biologicznego.
- J. Przy używaniu pipet automatycznych najpierw dodać odczynnik, a następnie lizat, należy unikać dotykania probówek końcówkami pipet dla zminimalizowania możliwości przeniesienia jakichkolwiek pozostałości z jednej probówki do następnej. Strumień odczynnika powinien być skierowany na wewnętrzną ściankę probówki, tak aby zapobiec rozpryskiwaniu. Ważne jest zachowanie ostrożności w trakcie pipetowania dla uniknięcia kontaminacji.
- K. Oddzielne pipety muszą być używane do etapów poprzedzających amplifikację i do tych po amplifikacji.
- L. Po odczytaniu probówek reakcyjnych w luminometrze, należy je zdekontaminować i ostrożnie usunąć zgodnie z PROCEDURĄ TESTU I UWAGAMI NA TEMAT POSTĘPOWANIA dotyczącymi unikania kontaminacji środowiska laboratoryjnego amplikonem.
- M. Samoprzylepne karty lub nakrętki powinny być usuwane natychmiast po zdjęciu ich z reakcyjnych probówek do specjalnego pojemnika zabezpieczającego przed skażeniem biologicznym. Zawsze należy używać czystych kart i korków, aby uniknąć bezpośredniej kontaminacji. Nigdy nie należy powtórnie używać tych materiałów. Samoprzylepne karty powinny być dobrze przyklejone na brzegu reakcyjnej probówki
- N. Nie należy przykrywać łaźni wodnej podczas inkubacji, szczególnie wówczas, gdy są używane zatraskowe korki. (Skraplanie oparów na wewnętrznej stronie pokrywy może być źródłem kontaminacji).
- O. Właściwe zworteksowanie próbek po dodaniu Odczynnika do Selekcji jest niezbędne do uzyskania prawidłowych wyników.
- P. Zaleca się wydzielenie osobnej powierzchni do wykonywania hybrydyzacji, Hybridization Protection Assay (HPA) dla zminimalizowania kontaminacji testu amplikonem. Ta wydzielona powierzchnia powinna być odizolowana od próbek, od powierzchni służącej do przygotowywania odczynników oraz od wykonywania amplifikacji.
- Q. Aby zapobiec kontaminacji laboratorium amplikonem, powierzchnia laboratorium powinna być rozplanowana zgodnie z jednokierunkowym systemem pracy. Przykładowo, powinno się przechodzić od próbek i przygotowywania odczynników do amplifikacji, następnie do pomieszczenia do hybrydyzacji (HPA). Próbkę, wyposażenie i odczynnik nie powinny wracać z powrotem do miejsca z poprzedniego etapu badań. Również personel nie powinien wracać do pomieszczeń poprzednich bez odpowiedniego zabezpieczenia przed kontaminacją. Mocno podkreśla się, że pomieszczenia zabezpieczającego przed skażeniem biologicznym używanego do opracowywania próbek nie należy używać do wykonywania testu MTD.

## OPIS I WYJAŚNIENIE ZASADY TESTU

Test MTD wykorzystuje Transcription-Mediated Amplification (TMA) i Hybridization Protection Assay (HPA<sup>2</sup>) do jakościowego wykrywania rybosomalnego kwasu nukleinowego (rRNA) *M. tuberculosis* complex. Test MTD będzie wykrywał rRNA z organizmów, które można wyhodować i takich, które się nie dają wyhodować. Do *M. tuberculosis* complex należą następujące organizmy: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* and *M. canetti* (12,13). Test MTD będzie wykrywał wszystkie organizmy należące do *M. tuberculosis* complex. Jednakże *M. microti* wywołuje infekcje jedynie u zwierząt, *M. bovis* jest rzadko przenoszony z zakażonych zwierząt na ludzi, a przypadki płucne choroby wywołane *M. africanum* u ludzi występują w tropikalnej Afryce<sup>12</sup>. *M. tuberculosis* jest najważniejszym organizmem z kompleksu, który jest odpowiedzialny za zachorowania ludzi na świecie. Ostatnie doniesienia CDC wskazują na wzrost liczby przypadków gruźlicy związanych z AIDS, z ludnością pochodzenia zagranicznego oraz w populacji preferującej zachowania o wysokim stopniu ryzyka<sup>6,9</sup>. Obserwuje się również wzrost liczby szczepów *M. tuberculosis* opornych na jeden lub kilka tuberkulostatyków<sup>11</sup>. Implikacje tych faktów dla zdrowia publicznego są znaczne.

Konwencjonalne metody hodowli wykrywają wzrost prątków gruźlicy najwcześniej po 1 tygodniu, ale mogą go wykrywać do 8 tygodni<sup>7,10</sup>. Dla porównania, testem MTD wykrywa się rRNA *M. tuberculosis* complex w 2.5 do 3.5 godziny od momentu rozpoczęcia badania. Dotychczas wprawdzie testem MTD nie można określić lekowrażliwości ale uzyskujemy szybkie i niezawodne wykrywanie *M. tuberculosis*. Dzięki temu można szybko odizolować pacjentów zakażonych, w większości przypadków rozpocząć odpowiednią terapię oraz wcześniej wykryć i zapobiec kontaktom z osobami zakażonymi<sup>3</sup>.

## ZASADA TESTU

Test MTD jest dwuetapowy, w którym amplifikacja i detekcja zachodzą w jednej probówce. W początkowym etapie komórki mykobakterii są poddawane sonikacji w celu uwolnienia kwasów nukleinowych. Podgrzewanie kwasów nukleinowych ma na celu ich denaturację i rozerwanie drugorzędowej struktury rRNA. Metoda Transcription-Mediated Amplification (TMA), wykorzystuje stałą temperaturę 42°C, w której dokonuje się amplifikacja specyficznego mykobakteryjnego docelowego

rRNA w drodze pośredniej transkrypcji DNA, w wyniku której powielane są wielokrotnie kopie mykobakteryjnego amplikonu RNA.

Specyficzne sekwencje *M. tuberculosis* complex są wykrywane w amplikonie RNA przy użyciu metody Hybridization Protection Assay (HPA)<sup>2</sup>. Odczynnik do Hybrydyzacji zawiera sondę z pojedynczej nici DNA znakowaną chemiluminescencyjnie. Ta sonda jest komplementarna do specyficznych sekwencji *M. tuberculosis* complex. Po utworzeniu pomiędzy sondą i specyficznymi sekwencjami stabilnej hybrydy RNA:DNA, zhybrydowana sonda jest oddzielana i oznaczana w luminometrze Leader™.

## ODCZYNNIKI ( OPAKOWANIE 50 TESTÓW )

**Uwaga:** Aby uzyskać informacje dotyczące zagrożeń oraz oświadczenia o środkach ostrożności w postępowaniu z odczynnikami, należy skorzystać z Safety Data Sheet Library [Biblioteki Kart Charakterystyki Bezpieczeństwa Substancji] pod adresem [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

Test MTD zawiera następujące odczynniki:

### MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFICATION

Nazwa odczynnika	Ilość
<b>Bufor do Rozcieńczania Próbkę dla Mycobacterium (SDB)</b> <i>Zbuforowany roztwór Tris zawierający &lt; 3% detergentu</i>	1 x 2.5 mL
<b>Odczynnik do Amplifikacji Mycobacterium (A)</b> <i>Liofilizowane kwasy nukleinowe stanowiące 5% masy w zbuforowanym roztworze trisu</i>	1 x 3 mL (po rekonstytucji)
<b>Bufor do Amplifikacji Mycobacterium (AB)</b> <i>Wodny roztwór ze środkiem konserwującym</i>	1 x 3 mL
<b>Odczynnik zawierający Olej dla Mycobacterium (O)</b> <i>Olej silikonowy</i>	1 x 10 mL
<b>Odczynnik zawierający Enzym dla Mycobacterium (E)</b> <i>Odwrotna transkryptaza i polimeraza RNA liofilizowana w HEPES zawierająca zbuforowany roztwór &lt; 10% masy enzymu i ≥ 15 mM N-acetylo-L-cysteiny</i>	1 x 1.5 mL (po rekonstytucji)
<b>Bufor do Rozcieńczania Enzymu dla Mycobacterium (EDB)</b> <i>Zbuforowany roztwór trisu zawierający substancję powierzchniowo czynną i glicerol</i>	1 x 1.5 mL

### MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HYBRIDIZATION

Nazwa odczynnika	Ilość
<b>Odczynnik do Hybrydyzacji dla Mycobacterium Tuberculosis (H)</b> <i>&lt; 100 ng/fiolkę nie-infekcyjnej sondy DNA znakowanej chemiluminescencyjnie zliofilizowanej w zbuforowanym roztworze bursztynianu zawierającej skoncentrowany czynnik i detergent</i>	1x6 mL (po rekonstytucji)
<b>Bufor do Hybrydyzacji dla Mycobacterium (HB)</b> <i>Zbuforowany roztwór bursztynianu zawierający &lt; 4% detergentu</i>	1 x 6 mL
<b>Odczynnik do Selekcji dla Mycobacterium (S)</b> <i>Roztwór zbuforowanego boranu zawierający substancję powierzchniowo czynną</i>	1x15 mL
<b>Probówki do Lizy dla Mycobacterium (LT)</b> <i>Szklane perełki, czynnik zwiększający objętość</i>	2 x 25 Probówek

## PRZECHOWYWANIE TESTU I WYMAGANIA HANDLOWE

A. Wymienione komponenty płynne i nie zrekonstruowane muszą być przechowywane w temp. od 2°C do 8°C i wówczas zachowują stabilność zgodnie z oznaczoną datą ważności:

- Bufor do Rozcieńczania Próbek dla Mycobacterium (SDB)
- Odczynnik do Amplifikacji dla Mycobacterium Tuberculosis (A)
- Bufor do Amplifikacji dla Mycobacterium (AB)
- Odczynnik zawierający Enzym dla Mycobacterium (E)
- Bufor do Rozcieńczania dla Mycobacterium (EDB)
- Odczynnik do Hybrydyzacji dla Mycobacterium Tuberculosis (H)

Zrekonstruowany Odczynnik do Amplifikacji (A) Mycobacterium Tuberculosis zachowuje stabilność przez 2 miesiące w temperaturze od 2°C do 8°C. Odczynnik do Hybrydyzacji (H) dla Mycobacterium Tuberculosis oraz Odczynnik zawierający Enzym (E) dla Mycobacterium pozostają stabilne przez 1 miesiąc w temp. od 2°C do 8°C od momentu rekonstrukcji lub przez 2 miesiące do dnia rekonstrukcji w temp. od -20°C lub niższej jeżeli są przechowywane w małych porcjach. Zamrożone porcje muszą być użyte w dniu rozmrożenia. Nie wolno używać zamrażarek rozmrażających się automatycznie.

B. Następujące komponenty zachowują stabilność zgodnie z oznaczoną datą ważności, jeżeli są przechowywane w temp. od 2°C do 25°C.

- Odczynnik zawierający Olej dla Mycobacterium (O)
- Bufor do Hybrydyzacji dla Mycobacterium (HB)
- Odczynnik do selekcji dla Mycobacterium (S)
- Probówki do Lizy dla Mycobacterium (LT)

## POBIERANIE PRÓBEK, PRZECHOWYWANIE, TRANSPORT I OPRACOWYWANIE

### Pobieranie i przechowywanie próbek

Próbki muszą być pobierane do jałowych plastikowych pojemników i przechowywane w temp. od 2°C do 8°C do momentu transportu lub zbadania. Próbki łącznie z próbkami klinicznymi nie powinny być przechowywane dłużej jak 4 dni (generalnie mniej niż 24 godziny) do momentu zbadania

### Transport:

Próbki należy przetransportować do laboratorium w jak najkrótszym czasie zgodnie z obowiązującymi przepisami.

### Opracowywanie (dekontaminacja i zagęszczanie):

Próbki, które są mocno skrwawione nie powinny być badane testem MTD. Test MTD jest przeznaczony do wykrywania rRNA z komórek *M. tuberculosis* complex pochodzącego z osadów próbek opracowanych ogólnie przyjętą, powszechnie stosowaną metodą z użyciem NALC-NaOH lub NaOH, zgodnie z protokołem dekontaminacji opisanym przez CDC z użyciem 1% do 1.5% NaOH przez 15 do 20 minut i wirowaniem w  $\geq 3,000 \times g$ .

### Przechowywanie opracowanego osadu:

Osady mogą być przechowywane w temp. od 2°C do 8°C do 3 dni przed wykonaniem testu lub do 6 miesięcy zamrożone do temp. -20°C lub -70°C. Zamrażarki rozmrażające się automatycznie nie mogą być używane.

**MATERIAŁY****A. Materiały dostarczone**

(bioMerieux Ref. No. 39006 / Hologic Cat. No. 301001)

**50 testów****MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS – ZESTAW DO AMPLIFIKACJI**

Bufor do Rozcieńczania Próbek (SDB)	1 x 2.5 mL
Odczynnik do Amplifikacji (A)	1 x 3 mL (po rekonstytucji)
Bufor do Amplifikacji (AB)	1 x 3 mL
Odczynnik zawierający Olej (O)	1 x 10mL
Odczynnik zawierający Enzym (E)	1 x 1.5 mL (po rekonstytucji)
Bufor do Rozcieńczania Enzymu (EDB)	1 x 1.5 mL

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS – ZESTAW DO HYBRYDYZACJI**

Odczynnik do Hybrydyzacji (H)	1 x 6 mL (po rekonstytucji)
Bufor do Hybrydyzacji (HB)	1 x 6 mL
Odczynnik do Selekcji (S)	1 x 15 mL
Probówki do Lizy (LT)	2 x 25 Probówek
Karty Samoprzylepne	1 opakowanie

**B. MATERIAŁY WYMAGANE ALE NIE DOSTARCZONE**

Mikropipety o pojemności 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, i 450µL

Mieszadło typu Vortex

Jałowa woda (filtrowana lub autoklawowana)

Probówki do Hodowli

Jałowe 3 mm perełki szklane

Zakręcane probówki do mikrowirówki

Kontrola Pozytywna Amplifikacji Komórek (*M. tuberculosis*, ATCC 25177 lub ATCC 27294)Kontrola Negatywna Amplifikacji Komórek (*M. gordonae*, ATCC 14470, lub *M. terrae*, ATCC 15755)

Bielinka (5.25% roztwór podchlorynu)

Plastikowy laboratoryjny pojemnik z przykrywą

1000 µL końcówki do pipet z hydrofobowym filtrem

**C. MATERIAŁY DODATKOWE, DOSTĘPNE U DYSTRYBUTORA HOLOGIC:**

Leader 50i Luminometr (bioMerieux ref. 39400 / Cat. No.103100i)

Sonikator (bioMerieux ref. 39409 / Cat. No. 901104)

Odczynniki do Detekcji (bioMerieux ref. 39300 / Cat. No. 201791)

MTD Kontrola do Amplifikacji (bioMerieux ref. 39223/ Cat. No. 301043F)

Sucha Łaźnia Wodna <sup>A</sup> (42° ± 1° C, 60° ± 1° C, i 95° ± 5° C) (bioMerieux ref. 39405, 39406, 39407 / Cat. No. 105524, 105524F, 105524J)

Statyw do Sonikatora (bioMerieux ref. 39313 / Cat. No. 104027)

Statywy do probówek (bioMerieux ref. 39311 / Cat. No. 104769)

Wydłużone końcówki z hydrofobowym filtrem (1250 µL) (bioMerieux ref. 39315 / Cat. No. 104316)

Probówki polipropylenowe 12 x 75 mm (bioMerieux ref. 39308 / Cat. No. 102440)

Polipropylenowe koreczki do 12 x 75 mm do probówek (bioMerieux ref. 39320 / Cat. No. 400713)



## PROCEDURA TESTU

### Kontrole

Komórki używane jako Kontrola Pozytywna Amplifikacji powinny należeć do kompleksu *M. tuberculosis* tak, jak awirulentny H37Ra (ATCC 25177) lub wirulentny szczep H37Rv (ATCC 27294). Komórki używane do Negatywnej Kontroli powinny należeć do grupy MOTT jak np. *M. goodii* (ATCC 14470) lub *M. terrae* (ATCC 15755). Kontrole muszą być przygotowane przed badaniem próbek

Kontrole muszą zawierać 25 - 150 CFU w 50 µL tak aby stężenie końcowe wynosiło 1-10 CFU na próbkę. To stężenie powinno być weryfikowane hodowlą. Takie kontrole komórkowe będą wykorzystane do przygotowania Kontroli w procesie Badania Próbek. (Zobacz Przygotowanie Próbek).

1. Sposób Przygotowania Kontroli komórkowej.
  - a. Umieścić 3 do 5 jałowych 3 mm perełek szklanych w czystej probówce hodowlanej.
  - b. Dodać 1-2 mL jałowej wody. Dodać kilka 1 µL pełnych oczek ezy z odpowiednich hodowli. Zamknąć probówki i wymieszać mieszadłem Vortex z dużą prędkością, kilkakrotnie powtarzając.
  - c. Pozostawić zawiesinę w spokoju przez 15 min.
  - d. Przenieść supernatant do czystej probówki hodowlanej. Dostosować zmętnienie do stężenia 1 w skali Mc Farlanda przy użyciu referencyjnego standardu nefelometrycznego Mc Farlanda.
  - e. Przygotować rozcieńczenie zawiesiny 1:100 przez przeniesienie 100 µL zawiesiny w skali 1 Mc Farlanda do 10 mL jałowej wody. Zamknąć i wymieszać mieszadłem Vortex. To jest Rozcieńczenie 1.
  - f. Przygotować rozcieńczenie drugie 1:100 przez przeniesienie 100 µL Rozcieńczenia 1 do 10 mL jałowej wody. Zamknąć i wymieszać mieszadłem Vortex. To jest Rozcieńczenie 2. To rozcieńczenie powinno zawierać około 25-150 CFU w 50 µL.

Porcjowanie i Przechowywanie Kontroli Komórkowej.

- a. Zawiesiny muszą być podzielone do czystych 1.5 mL zakręcanych probówek mikrowirówkowych na pojedyncze porcje (500 µL) i przechowywane w stanie zamrożenia w temp. -20° C przez 6 miesięcy lub -70° C przez 1 rok. Nie należy używać zamrażarki z automatycznym rozmrażaniem.

Testowanie rekomendowanej kontroli pozytywnej *M. tuberculosis* wykonuje się jedynie w przypadku istotnych nieprawidłowości w jej działaniu jako odczynnika. Kontrola pozytywna jest przeznaczona do sprawdzenia negatywnego wpływu odczynników NaOH i buforu fosforanowego użytych w nadmiarze do opracowywania próbek. Odchylenia proceduralne dotyczące czasu lub temperatury, które mogą mieć wpływ na wydajność amplifikacji lub stwierdzenia nieodpowiedniego czasu selekcji, nie mogą być wykrywane przy użyciu rekomendowanej kontroli komórkowej. Dodatkowe kontrole mogą być testowane zgodnie z instrukcją lub specjalnymi wymaganiami.

### 2. Kontrole Inhibicji Próbkki

Jeżeli test MTD jest negatywny, a lekarz ma duże podejrzenie gruźlicy u pacjenta, istnieje możliwość sprawdzenia inhibicji próbki, w następujący sposób:

- a. Dodać 50 µL Buforu do Rozcieńczania Próbek do 2 *Mycobacterium* Lysing Tubes (LT) (posianej i nie posianej).
- b. Dodać 50 µL Kontroli Pozytywnej komórek do Amplifikacji i 450 µL osadu do 1 probówki (posiana). Dodać 450 µL osadu do drugiej probówki (nie posiana). Wykonać dalej badanie jak zazwyczaj.

### Interpretacja

Jeżeli wartość RLU w posianej próbce jest  $\geq 30,000$ , wówczas próbka nie hamuje amplifikacji i jest oczywiste, że to nie próbka stanowi przeszkodę dla amplifikacji. Jeżeli wartość RLU w posianej próbce jest poniżej 30,000, wówczas to próbka hamuje amplifikację i należy ocenić następną próbkę. Jeżeli powtórne badanie nie posianych próbek okaże się pozytywne, wynik testu MTD należy określić jako pozytywny. Najprawdopodobniej wyjaśnieniem tego rodzaju wyniku jest zmienność losowa próbki; np. pierwsza porcja nie zawiera komórek do amplifikacji, podczas, gdy następną porcją te komórki zawiera. Wartość RLU nie posianych próbek może być albo pozytywna albo negatywna ponieważ próbka może zawierać lub nie zawiera *M. tuberculosis* rRNA.

### 3. Monitorowanie Kontroli Kontaminacji Laboratorium

Monitorowanie kontaminacji laboratorium amplikonem lub komórkami *M. tuberculosis*, przedstawia się następująco.

- a. Nalać 1 mL jałowej wody do czystej probówki. Zwilżyć jałowy polistyrenowy lub dakronowy wacik w jałowej wodzie.
- b. Wyrzeć powierzchnię i sprzęt przeznaczony do badań.
- c. Umieścić wacik w wodzie i energicznie wytrząsnąć. Usunąć wacik po wyciśnięciu go o ściankę probówki. Wacik umieścić w pojemniku z podchlorynem wapnia rozcieńczonym w stosunku 1:1.
- d. Dodać 25 µL wody wyciśniętej z wacika do Probówki do Amplifikacji zawierającej 50 µL Odczynnika do Amplifikacji i 200 µL Oleju.
- e. Następnie stosować PROCEDURĘ TESTU dla amplifikacji i detekcji.

### Interpretacja

Jeżeli wynik wynosi  $\geq 30,000$  RLU, wówczas powierzchnia jest skontaminowana i powinna być poddana dekontaminacji przez oczyszczenie podchlorynem wapnia, tak jak zaleca PROCEDURA TESTU, Przygotowanie Sprzętu. Jeżeli podejrzewamy kontaminację łaźni wodnej, należy zamplifikować 25  $\mu\text{L}$  wody z łaźni wodnej bez stosowania czynników antybakteryjnych tak, jak to opisano dla materiału z wyciśniętego wymazu.

### Przygotowanie Sprzętu

1. W celu uzyskania optymalnego przemieszczania się energii ultradźwiękowej w sonikatorze, należy dokładnie odgazować wodę przed każdym użyciem sonikatora zgodnie z następującym postępowaniem:
  - a. Wypełnić sonikator wodą o temp. otoczenia, tak aby odstęp od górnego brzegu wynosił 1,27 cm (odpowiada 1/2 inch)
  - b. Włączyć sonikator na 15 minut w celu dokładnego odgazowania wody.
2. Ustawić jedną suchą łaźnię na 95° C, drugą suchą łaźnię lub łaźnię wodną na 60° C i następną suchą łaźnię lub łaźnię wodną na 42°  $\pm$  1° C.
3. Przetrzeć miejsce pracy, sprzęt i pipety podchlorynem wapnia rozcieńczonym wodą 1:1 przed rozpoczęciem pracy. Podchloryn wapnia musi być w kontakcie z powierzchnią nie krócej niż 15 minut. Miejsce pracy należy przetrzeć wodą aby usunąć podchloryn wapnia. Przykryć powierzchnię, na której będą wykonywane badania plastikową tacą laboratoryjną zakrywającą blat.
4. Przygotować do pracy Luminometr Leader. Należy zwrócić uwagę na to, czy są wystarczające ilości Odczynników do Detekcji I i II do odczytania testów i zapewnić jak najlepszą jakość odczynników. Zapoznać się z Instrukcją Obsługi Luminometru w celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących Odczynników do Detekcji. (Odczynniki do detekcji są sprzedawane oddzielnie).

### Przygotowanie Odczynników

Zrekonstruować zliofilizowaną fiolkę (50 testów) Odczynnika do Amplifikacji Mycobacterium Tuberculosis (A) przez dodanie 3.0 mL Buforu do Amplifikacji (AB). Wymieszać mieszadłem Vortex do całkowitego rozpuszczenia. Pozostawić *rekonstruowany* odczynnik w temperaturze pokojowej dopóki nie będzie klarowny. Zrekonstruowany Odczynnik do Amplifikacji może być przechowywany w temp. od 2° C do 8° C przez 2 miesiące. Przed użyciem do badań należy zrekonstruowany Odczynnik do Amplifikacji pozostawić w temperaturze pokojowej.

### Przygotowanie Próbek

1. Oznakować odpowiednim numerem Probówki do Lizy Mycobacterium (LT) przygotowane do badania próbek oraz każdą z dwóch Kontroli Pozytywną i Negatywną Kontrolę Amplifikacji Komórek i Kontrolę Pozytywną i Negatywną Badanych Próbek. Zdjąć i zachować koreczki.
2. Odpipetować 50  $\mu\text{L}$  Buforu do Rozcieńczania Próbkę (SDB) do wszystkich Probówek do Lizy (LT). Następnie do kontroli oznakowanych A i B oraz C dla próbek.
  - A. Kontrola Opracowywania Próbek:

Do każdej kontroli dodać 1mL roztworu NALC/NaOH i 3 mL buforu fosforanowego używanych do opracowywania plwociny z 1mL jałowej wody do probówki dla opracowania próbki.

    - i. Wymieszać mieszadłem Vortex.
    - ii. Przenieść 450  $\mu\text{L}$  NALC/NaOH/ z roztworem buforu fosforanowego i 50  $\mu\text{L}$  rozcieńczonej kontroli komórek do odpowiednio oznakowanych próbek do Lizy (LT).
  - B. Po przygotowaniu Kontroli Amplifikacji Komórek, przenieść 450  $\mu\text{L}$  Kontroli Amplifikacji Komórek z tego pojemnika do odpowiednio oznakowanej Probówki do Lizy (LT).
  - C. Próbką: Przenieść 450  $\mu\text{L}$  próbki zdekontaminowanej i dobrze wymieszanej mieszadłem Vortex z tego pojemnika do odpowiednio oznakowanej Probówki do Lizy (LT).
3. Przykryć Probówki do Lizy (LT) po dodaniu każdej próbki.
4. Wymieszać mieszadłem Vortex przez 3 sekundy.

### Lizowanie Próbek

1. Wcisnąć Probówki do Lizy Mycobacterium (LT) do statywu sonikatora, tak aby reakcja mieszania zachodziła w dolnej zanurzonej w wodzie części probówki, podczas gdy górna przykryta część probówki pozostaje nad wodą. Umieścić Statyw Sonikatora na łaźni wodnej sonikatora. PROBÓWKI NIE MOGĄ DOTYKAĆ DO DNA ANI DO ŚCIANEK SONIKATORA.
2. Sonikować przez 15 minut ale nie dłużej niż 20 minut. Zsonikowane próbki i kontrole są określane mianem „lizatu” LIZATÓW NIE NALEŻY MIESZAĆ MIESZADŁEM VORTEX.

### Amplifikacja

1. Oznaczyć probówki do amplifikacji (12 x 75 mm probówki polipropylenowe) blisko górnego brzegu takim samym numerem, jak Probówkom do Lizy (LT). Również opisać probówki do amplifikacji dla każdej kontroli amplifikacji, Pozytywnej i Negatywnej. Jeżeli będą użyte kontrole RNA, oznaczyć probówki do amplifikacji numerami odpowiadającymi Negatywnej i Pozytywnej Kontroli.
2. Dodać 50 µL zrekonstruowanego Odczynnika do Amplifikacji na dno każdej probówki do amplifikacji, przy użyciu pipety automatycznej. Dodać 200 µL Oleju (O) do każdej probówki do amplifikacji przy użyciu pipety automatycznej.
3. **NIE NALEŻY LIZATU MIESZAĆ MIESZADŁEM VORTEX.** Przenieść 25 µL lizatu na dno odpowiednio oznakowanych probówek do amplifikacji używając do każdej probówki oddzielnej wydłużonej jednorazowej końcówki z hydrofobowym filtrem. Pozostały lizat może być przechowywany w temp. 2° C do 8° C przez 7 dni lub zamrożony w -20° C poniżej do 1 miesiąca. Nie należy używać automatycznie rozmrażającej się zamrażarki. W razie konieczności wykonania dodatkowych testów z przygotowanego wcześniej lizatu z próbki pacjenta, należy przenieść przechowywany lizat do temperatury pokojowej. **NIE NALEŻY MIESZAĆ LIZATU MIESZADŁEM VORTEX.**
4. Inkubować probówki w temp. 95° C przez 15 minut w suchej łaźni, ale nie dłużej niż 20 minut.
5. Przygotować enzym dodając 1.5 mL Buforu do Rozcieńczenia Enzymu (EDB) do liofilizatu Odczynnika z Enzymem (E). Wymieszać ruchem wirowym. Nie używać mieszadła Vortex. *Zrekonstruowany* Odczynnik zawierający Enzymem zachowuje stabilność przez 1 miesiąc przechowywany w temp. od 2° C to 8° C lub 2 miesiące w temp. -20° C lub niższej, jeżeli został podzielony na porcje i zamrożony w dniu rekonstrukcji.<sup>B</sup> Używane do badań porcje enzymu, najpierw należy przenieść do temperatury pokojowej: nie używać podwyższonej temperatury do rozpuszczania enzymu. Wymieszać porcję enzymu po rozmrożeniu, przez kilkakrotne energiczne wciąganie i wypuszczanie z pipety przed dodaniem do probówek do amplifikacji.
6. Przenieść probówki do suchej łaźni lub łaźni wodnej o temp. 42° ± 1° C i pozostawić do ostygnięcia na 5 minut. **NIE ZOSTAWIĄC PROBÓWEK DO OSTYGNIECIA W TEMPERATURZE POKOJOWEJ. NIE PRZYKRYWAĆ ŁAŻNI WODNEJ.**
7. Dodać 25 µL mieszaniny enzymu do każdej probówki do amplifikacji używając pipety automatycznej nie wyjmując probówek z łaźni o temp. 42° ± 1° C. Wymieszać probówki lekko wstrząsając. Inkubować w temp. 42° C przez 30 minut, lecz nie więcej niż 60 minut. Podczas tego etapu inkubacji należy użyć samoprzylepnych kart lub korków do zamknięcia probówek. **NIE PRZYKRYWAĆ ŁAŻNI WODNEJ.**
8. Przykryte probówki mogą być pozostawione w temp. od 2° C do 8° C do 2 godzin lub w temp. -20° C przez całą noc po 30 minutach inkubacji. Jeżeli probówki są przetrzymane w temp. -20° C przez całą noc, wówczas należy je dokładnie rozmrozić w temp. pokojowej lub w temp. nie większej niż 60° C przed etapem Hybrydyzacji. Jeżeli probówki są przetrzymywane całą noc należy użyć korków zamiast samoprzylepnych kart.

### Hybrydyzacja

1. Zrekonstruować liofilizowany Odczynnik do Hybrydyzacji (H) dodając 6 mL Buforu do Hybrydyzacji (HB). Przed przystąpieniem do rekonstrukcji należy Odczynnik do Hybrydyzacji (H) i Bufor do Hybrydyzacji (HB) doprowadzić do temperatury pokojowej. Jeżeli Bufor do Hybrydyzacji będzie oziębiony, należy podgrzać go do 60° C energicznie obracając fiolką tak, aby wszystkie składniki zostały dokładnie rozpuszczone. Aby zapewnić dokładne wymieszanie wszystkich składników, użyć mieszadła Vortex (nie dłużej niż 1 minutę). *Zrekonstruowany* Odczynnik do Hybrydyzacji zachowuje stabilność przez 1 miesiąc w temp. 2° C do 8° C lub przez 2 miesiące w temp. -20° C lub niższej jeżeli jest zamrożony w porcjach w dniu rekonstrukcji.<sup>C</sup> Jeżeli zrekonstruowany Odczynnik do Hybrydyzacji będzie oziębiony lub zamrożony, należy go podgrzać do temp. 60° C energicznie obracając w celu dokładnego wymieszania składników.
2. Dodać 100 µL *zrekonstruowanego* Odczynnika do Hybrydyzacji do wszystkich probówek używając automatycznej pipety. Przykryć probówki kartami samoprzylepnymi lub korkami. Wymieszać mieszadłem Vortex 3 razy ze średnią prędkością **co najmniej** 1 pełną sekundę za każdym razem.<sup>D</sup> W trakcie procesu mieszania utrzymać probówki w pionowej pozycji, tak aby mieszanina w probówce sięgała tylko do połowy jej wysokości. (To zapobiegnie możliwości kontaminacji, jeżeli nie pozwolimy na styczność mieszaniny reakcyjnej z kartami samoprzylepnymi ani z korkami). Po dokładnym wymieszaniu mieszanina reakcyjna powinna osiągnąć jednolitą żółtą barwę.
3. Inkubować w temp. 60° C przez 15 minut, ale nie dłużej niż 20 minut, w suchej łaźni lub w łaźni wodnej.

### Selekcja

1. Odczynnik do Selekcji (S) musi osiągnąć temperaturę pokojową przed rozpoczęciem badań. Wyjąć probówki z łaźni wodnej lub suchej łaźni z temp. 60° C i dodać 300 µL Odczynnika do Selekcji (S) używając automatycznej pipety. Przykryć probówki samoprzylepnymi kartami lub korkami. Wymieszać mieszadłem Vortex 3 razy ze średnią prędkością **co najmniej** 1 pełną sekundę za każdym razem.<sup>D</sup> W trakcie procesu mieszania utrzymać probówki w pionowej pozycji, tak aby mieszanina w probówce sięgała tylko do połowy jej wysokości. (To zapobiegnie możliwości kontaminacji, jeżeli nie pozwolimy na styczność mieszaniny reakcyjnej z kartami samoprzylepnymi ani z korkami). Po dokładnym wymieszaniu mieszanina reakcyjna powinna osiągnąć jednolitą różową barwę.



2. Inkubować probówki w temp. 60° C przez 15 minut, ale nie dłużej niż 16 minut, w suchej łaźni lub łaźni wodnej.
3. Wyjąć probówki z łaźni wodnej lub suchej łaźni. Oziębic probówki do temperatury pokojowej przez następne 5 minut ale nie dłużej niż przez 1 godzinę. Zdjąć samoprzylepne karty lub korki tuż przed odczytem.

#### Odczyt wyniku

1. Wybrać odpowiedni protokół z oprogramowania luminometru. Czas odczytu wynosi 2 sekundy.
2. Użyć wilgotnej tkaniny lub wilgotnego ręcznika papierowego, wytrzeć każdą probówkę zabezpieczając przed pozostałościami na zewnętrznych ściankach probówek i wstawić probówkę do luminometru zgodnie z instrukcją aparatu. Probówki muszą być odczytane do 1 godziny od wykonania 3 etapu selekcji.
3. Po odczytaniu wyniku, wyjąć probówkę(i) z luminometru.
4. Po odczytaniu probówek reakcyjnych ostrożnie napełnić je po sam wierzch 1:9 rozcieńczonym podchlorynem wapnia, używając tryskawki. Pozostawić probówki z podchlorynem wapnia przez minimum 1 godzinę zanim nie zostanie zniszczony materiał genetyczny. Takie postępowanie jest konieczne dla zapobiegania kontaminacji amplikonem środowiska laboratoryjnego.
5. Statywy do probówek, w których wykonywane jest badanie łącznie ze statywami służącymi dla próbek i testów powinny być dekontaminowane przez całkowite zanurzenie na minimum 15 minut w podchlorynie wapnia rozcieńczonym 1:1 wodą. Następnie podchloryn wapnia należy zmyć wodą i statywy wytrzeć do wyschnięcia na powietrzu.
6. Powierzchnię laboratoryjną i sprzęt zdekontaminować 1:1 rozcieńczonym podchlorynem wapnia.

#### Powtarzanie badań

1. Jeżeli będzie potrzeba wykonania dodatkowych badań z lizatu próbki pacjenta, przenieść przygotowany lizat do temperatury pokojowej. **NIE MIESZAĆ LIZATU MIESZADŁEM VORTEX.**
2. Zastosować PROCEDURĘ TESTU zgodnie z przedstawionym protokołem, zaczynając od Amplifikacji.

### UWAGI PRAKTYCZNE

#### A. Odczynniki

1. Odczynnik zawierający Enzym nie powinien być trzymany w temperaturze pokojowej dłużej niż 15 minut po zrekonstruowaniu.
2. Bufor do Hybrydyzacji (HB) może się wytrącać. Podgrzanie i wymieszanie Buforu do Hybrydyzacji (HB) lub *zrekonstruowanie* Odczynnika do Hybrydyzacji w 60° C będzie rozpuszczało precypitat.

#### B. Temperatura

1. Reakcja amplifikacji, hybrydyzacji i selekcji są temperaturo zależne; łaźnia wodna lub sucha łaźnia utrzymują odpowiedni zakres temperatur.
2. Probówki muszą być ochładzane do temp. 42° C przez 5 minut przed dodaniem mieszaniny enzymatycznej w celu zapewnienia optymalnych warunków dla amplifikacji.
3. Krytyczną temperaturą dla amplifikacji jest (42° ±1°C).

#### C. Czas

Czas limituje specyficzności w stosowanej PROCEDURZE TESTU.

#### D. Łaźnia wodna

1. Poziom wody w łaźni wodnej powinien zabezpieczyć całkowite zanurzenie części z płynnymi odczynnikami w probówce, jednak poziom wody nie może być zbyt wysoki aby woda nie dostała się do wnętrza probówek.
2. Podczas Amplifikacji, nie należy przykrywać łaźni wodnej aby uniknąć skondensowania kropelek wewnątrz i na zewnątrz probówek.

#### E. Mieszanie mieszadłem typu Vortex.

Ważne jest aby mieszanina podczas Hybrydyzacji i Selekcji była homogenna, specyficzna po dodaniu *zrekonstruowanego* Odczynnika do Hybrydyzacji (H) (reakcją na wymieszanie będzie jednolity żółty kolor) po dodaniu Odczynnika do Selekcji (S) (reakcją na wymieszanie będzie kolor różowy).

Worteksowanie jest zabiegiem służącym do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Wówczas, gdy odczynniki są w probówkach i są źródłem dostarczającym zewnętrznej energii, szybka rotacja roztworu wytwarza w probówce oś obrotu. Moc tych szybkich obrotów powoduje, że badana zawiesina jest jednorodna. Podczas worteksowania probówki powinny być w pozycji pionowej, pionowa pozycja i podtrzymanie odpowiedniego poziomu w probówce zapewnia osiągnięcie prawidłowego wymieszania.

Jeżeli jest osiągnięta właściwa prędkość worteksowania, wirowo obracająca się zawiesina podnosi się do połowy wysokości probówki. Podczas Hybrydyzacji i Selekcji takie postępowanie jest stosowane kolejno 3 razy po sobie i podtrzymywane jest worteksowanie **co najmniej przez 1 pełną sekundę za każdym razem.**

## INTERPRETACJA TESTU

Wynik badania próbek oznaczanych testem Bezpośredniej Amplifikacji Mycobacterium Tuberculosis (MTD) jest interpretowany na podstawie początkowych wyników kontroli negatywnej (< 30,000 RLU) oraz kontroli pozytywnej (≥ 500,000 RLU) lub początkowego niejednoznacznego wyniku (30,000 do 499,999 RLU). Test MTD powinien być powtórzony z zachowanego lizatu, jeżeli wynik jest wątpliwy. Powtórzony wynik z lizatu > 30,000 RLU jest uważany za pozytywny.

### A. Jakość Wyników Kontroli i Potwierdzających

Kontrole powinny dawać następujące wartości:

- Kontrola Negatywna Amplifikacji komórek < 20,000 RLU
- Kontrola Pozytywna Amplifikacji komórek ≥ 500,000 RLU
- Kontrola Negatywna Badanej Próbki < 20,000 RLU
- Kontrola Pozytywna Badanej Próbki ≥ 1,000,000 RLU

Wyniki testu pacjenta nie mogą być przyjęte, jeżeli wyżej wymienione wartości kontroli testu MTD nie są właściwe. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z działem dotyczącym trudności.

Docelowe wartości kontroli powinny być określone w każdym laboratorium posługując się wynikami testu dla każdej partii przygotowywanych kontroli.

### B. Wyniki badań pacjenta

Jeżeli kontrole nie dają oczekiwanych wyników, wyniki uzyskane w tej samej serii badań dotyczące próbek pacjenta nie mogą być akceptowane.

#### Wyniki:

- ≥ 500,000 RLU dodatni dla *M. tuberculosis complex* rRNA
- < 30,000 RLU ujemny dla *M. tuberculosis complex* rRNA
- 30,000 do 499,999 RLU prawdopodobnie *M. tuberculosis complex* rRNA pozytywny; powtórzyć w celu weryfikacji wyniku:

Powtórzenie ≥ 30,000 RLU dodatni dla *M. tuberculosis complex* rRNA

Powtórzenie < 30,000 RLU negatywny dla *M. tuberculosis complex* rRNA

## FORMUŁOWANIE WYNIKÓW

Wyniki testu MTD powinny być interpretowane razem z innymi wynikami laboratoryjnymi i klinicznymi dostępnymi dla lekarza. Podstawą dla potwierdzenia klinicznego podejrzenia gruźlicy powinno być rozważenie zbadania dodatkowych próbek.

Jeżeli otrzymane wyniki testu MTD są pozytywne ≥ 500,000 RLU, lub powtórzony wynik testu MTD jest pozytywny ≥ 30,000 RLU, wówczas wynik jest następujący:

Wynik:	Stwierdzono Mycobacterium tuberculosis complex rRNA W preparacie bezpośrednim stwierdzono (lub nie stwierdzono) prątki kwasooporne.
Informacja dodatkowa	Hodowla prątków w trakcie inkubacji. W próbce mogą być obecne MOTT i <i>M. tuberculosis</i> lub tylko <i>M. tuberculosis</i> . To badanie nie powinno być jedyną podstawą diagnozowania gruźlicy. Pozytywne prognozowanie u pacjentów z wynikiem negatywnym preparatu bezpośredniego jest mniej korzystne aniżeli u pacjentów z pozytywnym wynikiem preparatu bezpośredniego. To jest szczególnie istotne przy badaniu populacji, w której zapadalność na gruźlicę jest niska i wówczas pozytywne prognozowanie oceny metod diagnostycznych obniża się.

Jeżeli początkowy lub powtórzony wynik testu MTD jest negatywny przy <30,000 RLU, wówczas wynik jest następujący:

Wynik:	Nie stwierdzono <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex rRNA. W preparacie bezpośrednim (stwierdzono lub nie stwierdzono) prątki kwasoodporne
Informacje dodatkowe	Nie stwierdzono <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex rRNA. Hodowla prątków jest w trakcie inkubacji. Próbkę może nie zawierać <i>M. tuberculosis</i> , wynik może być fałszywie negatywny z chwilą obniżenia liczby komórek <i>M. tuberculosis</i> w obecności lub nieobecności MOTT, lub wynik może być fałszywie ujemny, kiedy odczyn koliduje z inhibitorami próbek. W takim przypadku zaleca się badanie następnych próbek od pacjenta, jeżeli podejrzewana jest aktywna postać gruźlicy lub może występować inhibicja próbki.

## OGRANICZENIA

Stosować wyłącznie do wykrywania *M. tuberculosis* complex używając osadów opracowanych NALC-NaOH lub NaOH metodami zalecanymi przez CDC<sup>7</sup>. Ten test ma zastosowanie jedynie do badania osadów z płwociny (indukowanej lub odkrztuszonej, aspiratów tchawiczych, lub aspiratów oskrzelowych (np. popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i popłuczyn oskrzelowych).

Test MTD jest specyficzny dla *M. tuberculosis* complex ale nie różnicuje przedstawicieli w obrębie kompleksu na: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, a *M. celatum*, i *M. terrae*-like mogą dawać pozytywną reakcję bezpośrednią jeżeli na test przypadnie więcej niż 30 jednostek CFU. Jednakże *M. celatum* i *M. terrae*-like są rzadko izolowane z przypadków klinicznych.

Na wynik testu mogą mieć wpływ sposób pobierania próbek, transport, zmienność pobieranych próbek, błędy laboratoryjne, błędna identyfikacja i błędy w zapisywaniu. Negatywny wynik testu nie wyklucza możliwości izolacji z próbki *M. tuberculosis* complex.

## OCZEKIWANE WARTOŚCI

### A. Zakres Wartości Kontroli Obserwowanych w Badaniach Klinicznych.

Wartości kontroli wyrażone w jednostkach RLU obserwowane w 7 ośrodkach klinicznych były następujące:

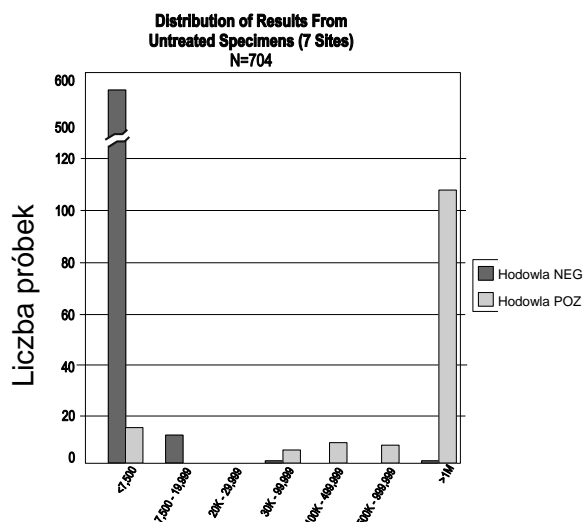
	RLU (N=704)	
	Zakres	Srednia
<b>Kontrola Pozytywna Amplifikacji Komórek</b>	556,245 do >2,000,000	>2,000,000
<b>Kontrola Negatywna Amplifikacji Komórek</b>	904 do 18,754	3,041

## B. Zakres Wartości RLU dla Próbek Klinicznych

Wartości RLU dla 127 próbek, które były pozytywne w teście MTD wynosiły od 35,777 do > 2,000,000 RLU. Dla 577 próbek, które były negatywne w teście MTD, wartości wynosiły od 573 do 19,176 RLU.

Częstość rozkładu wartości RLU dla wszystkich tych próbek po analizie rozbieżności jest pokazana poniżej. Analiza rozbieżności jest podstawą do wyjaśnienia obecności innych hodowli pozytywnych z próbek tego samego pacjenta i/lub dla lekarza, który stawia ostateczną diagnozę.

Rozkład Wyników z Próbek Pacjentów Nie Leczonych  
(7 Ośrodków)  
N=704



Wyniki hodowli

<i>M. tuberculosis</i> NEG	554	10	0	1	0	0	1
<i>M. tuberculosis</i> POZ	13	0	0	4	7	6	108

## Charakterystyka

### A. Ocena Kliniczna

Oryginalny test MTD był oceniany przy pomocy badań prowadzonych w 6 ośrodkach przez porównanie wyników preparatów do wyników hodowli 6,079 próbek od 2,609 pacjentów. Z tego 4,000 próbek zostało pobranych od 1,898 pacjentów nie leczonych lekami przeciwgruźliczymi. Tych 6 ośrodków prowadzących badania było różnie rozmieszczonych pod względem geograficznym; z czego 5 było dużymi miejskimi centrami szpitalnymi, z oddziałami leczącymi gruźlicę i jeden był urzędowym laboratorium zdrowia publicznego.

Będący w użyciu test MTD oceniano w oddzielnych 7 ośrodkach przez porównanie wyników testu MTD do wyników hodowli mykobakterii. Tych 7 ośrodków było różnie rozmieszczonych pod względem geograficznym; z czego 6 ośrodków było dużymi miejskimi centrami szpitalnymi z oddziałami leczącymi gruźlicę i jeden państwowym laboratorium mykobakteriologicznym.

Siedem ośrodków było laboratoriami zdrowia publicznego. Próbkę do badań pochodziły od pacjentów nie leczonych, z których 132 hodowle były pozytywne dla *M. tuberculosis* complex. Badanie testem MTD wykazało 119 próbek dodatnich, spośród tych, które były pozytywne w hodowli; z 7 próbek wyhodowano MOTT oprócz *M. tuberculosis*.

**PRÓBKİ OD PACJENTÓW NIELECZONYCH  
MTD vs. Hodowla (N=704)**

		DLA PACJENTA (PRZED ANALIZĄ) Hodowla		DLA PACJENTA (PO ANALIZIE) Hodowla	
		+	-	+	-
MT	+	54	4	56	2
D	-	4	221	4	221

		DLA PRÓBKİ (PRZED ANALIZĄ) Hodowla		DLA PRÓBKİ (PO ANALIZIE) Hodowla	
		+	-	+	-
MT	+	119	8	125	2
D	-	13	564	13	564

Do tych badań byli wybierani pacjenci z podejrzeniem aktywnej postaci gruźlicy i nie poddani żadnej terapii. Zachorowalność pacjentów, u których hodowla *M. tuberculosis* była pozytywna wynosiła 20.5%.

Czułość powyższego testu MTD dla pacjenta była 93.3% i specyficzność dla pacjenta była 99.1% w porównaniu do wyników hodowli. Czułość powyższego testu MTD dla próbki wynosiła 90.6% i specyficzność dla próbki wynosiła 99.6% w porównaniu do wyników hodowli. Wyniki z 7 ośrodków dotyczące czułości, specyficzności, Pozytywna Przewidywana Wartość (PPV) i Negatywna Przewidywana Wartość (NPV) są pokazane w następujących tabelach, wzdłuż z 95% przedziałem ufności dla oznaczeń szacunkowych. Wszystkie dane pokazują analizę rozbieżności, która jest podstawą do wyjaśnienia obecności innych hodowli pozytywnych uzyskanych z próbek tego samego pacjenta i/lub dla lekarza, który stawia ostateczną diagnozę.

Dla Pacjenta:

	Ogólny Procent	Ilości przeciwne Ogółem	95% Przedział Ufności
Czułość	93.3%	56/60	83.8-98.2%
Specyficzność	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%

Dla Próbkę:

	Ogólny Procent	Ilości przeciwne Ogółem	95% Przedział Ufności
Czułość	90.6%	125/138	84.4-94.9%
Specyficzność	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%

Spośród 564 próbek, które poddano hodowli i w których nie wykryto *M. tuberculosis* complex testem MTD, ze 114 próbek wyhodowano MOTT, 64 pochodziły od pacjentów, u których wcześniej wyhodowano MOTT i 169 pochodziło od pacjentów, u których hodowle były negatywne.

#### B. Badanie dokładności

Panel dokładności, składający się z 2 negatywnych próbek, 2 słabo pozytywnych próbek (<sup>a</sup> 100 CFU/test) i 2 umiarkowanie pozytywnych próbek (<sup>a</sup> 1000 CFU/test) był badany w 3 ośrodkach. Pozytywne próbki były przygotowywane ostro zakończoną eżą aby znaleźć hamujące inhibitory płynnego osadu w znanej ilości *M. tuberculosis*. Pozytywne i negatywne kontrole amplifikacji były włączone do każdego badania.

Ponieważ nie zaobserwowano wyraźnej zmienności w poszczególnych ośrodkach, ani w badaniach z poszczególnych dni, wyniki z 3 ośrodków zostały połączone i przedstawione poniżej. Mierzone wartości RLU są limitowane przez tubę ftopowielacza luminometru. Jednakże wartości większe od 2,000,000 RLU są skrócone. Nie podano odchylenia standardowego i wartości % CV.



	Badanie dokładności			
	# Badane Próbkki	% Poprawny	Zakres (RLU)	Średnia (RLU)
Próbka 1 Wysoko Pozytywna	108	100%	154,103 ->2,000,000	>2,000,000
Próbka 2 Nisko Pozytywna	108	99.1%	16,324 ->2,000,000'	>2,000,000
Próbki Negatywne	108	100%	2,004 - 5,693	2,689
Kontrola Pozytywna Komórkowa Control	54	100%	>2,000,000	>2,000,000
Kontrola Negatywna	54	100%	2,272 - 4,241	2,944

•Jedna próbka negatywna.

### C. Powtarzalność

Panel powtarzalności składał się z 25 próbek z Kontroli Negatywnych Amplifikacji porzucanych pomiędzy wszystkimi 50 próbkami. Panel powtarzalności był badany w 4 ośrodkach. Ogólnie 100% (120/120) próbek negatywnych dało spodziewane wyniki i 98,8% (79/80) pozytywnych próbek również dało spodziewane wyniki.

### D. Analiza Specyficzności

Specyficzność testu MTD była oceniana przy pomocy bakterii, grzybów, i wirusów. Do badania specyficzności bakterii i grzybów włączono 160 szczepów (151 szczepów z 62 rodzajów) ściśle związanych z mykobakteriami, inne organizmy wywołujące choroby płuc, i florę fizjologiczną układu oddechowego lub organizmy reprezentujące krzyżówki filogenetyczne. Szczepy były typowane przez American Type Culture Collection (ATCC) a 5 izolatów pochodziło z klinicznych laboratoriów. Lizaty przygotowano z żywych hodowli (lub rRNA w 3 przypadkach) były oceniane testem MTD zgodnie z PROCEDURĄ TESTU. Koncentracja CFU/ na reakcję wynosiła około  $5 \times 10^7$ . Jedynie szczepy *M. tuberculosis* complex wytwarzały pozytywną reakcję, za wyjątkiem szczepów *M. celatum* i *M. terrae*-like.

Stężenie ponad 30 CFU na test, *M. celatum* i niektórych szczepów *M. terrae*-like może dawać pozytywny wynik testu MTD. Poziom 30 CFU na test, *M. celatum* dawał 26,772 RLU i *M. terrae*-like był w zakresie od 19,470 do 49,976 RLU.

### E. Ograniczenia w Wykrywaniu

Testem MTD zbadano trzydzieści (30) szczepów *M. tuberculosis* geograficznie szeroko rozprzestrzenionych, łącznie z przedstawicielami szczepów lekoopornych i wrażliwych na leki. Testem MTD wykrywano 1 CFU przypadającą na test we wszystkich 30 szczepach.

### F. Odzyskiwanie

Dwadzieścia pięć (25) fg *Mycobacterium tuberculosis* rRNA (odpowiednik 5 CFU na test) zbadano w obecności około 540,000 CFU na test (450 µL) następujących wybranych organizmów.: *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*, i *Rhodococcus bronchialis*. Wszystkie wyniki badań były pozytywne dla *M. tuberculosis* rRNA w obecności tych wybranych lecz nie będących celem oznaczania organizmów.

## ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

OBSERWOWANE	PRZYCZYNY	ZALECENIA
Podwyższenie wartości wyników Amplification Kontroli Negatywnej Komórek, lub Kontroli Negatywnej Badanej Probki ( $\geq 20.000$ RLU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niewystarczająco wymieszana lub zbyt mała objętość dodawanego odczynnika Mycobacterium Selection Reagent (S).</li> <li>Brak zachowania wystarczającej ostrożności w trakcie wykonywania badania, wynikiem czego może być amplifikacja skontaminowanego w tym momencie materiału.</li> <li>Pominięcie 5-min. etapu chłodzenia próbek.</li> <li>Kontaminacja powierzchni lab., lub odczynników.</li> <li>Nieprawidłowe wytarcie próbek przed odczytem w luminometrze.</li> </ul>	<p>Uzyskać homogenność mieszaniny. Zapewnić dodanie odpowiedniej objętości tej mieszaniny. Wizualnie sprawdzić ujednoczenie różowego zabarwienia po wymieszaniu na wortexie.</p> <p>Zachować wyjątkową ostrożność w trakcie pipetowania. Przed wyrzuceniem próbek reakcyjnych należy je zdekontaminować wodą wapienną w stężeniu 1:9 tak, jak opisano w części PROCEDURA TESTU. Powierzchnie blatów laboratoryjnych, suche łaźnie, łaźnie wodne, pipety automatyczne, muszą być zdekontaminowane w roztworze wody wapiennej o stężeniu 1:1 jak opisano w części PROCEDURA TESTU.</p>
Obniżenie wyników amplifikacji Kontroli Pozytywnej Komórek lub Kontroli Pozytywnej badanej próbki ( $< 500.000$ RLU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Przeprowadzenie etapu amplifikacji niezgodnie z zalecanym zakresem temperatur.</li> <li>Dodawanie Odczynnika do Amplifikacji po ściance zamiast na dno próbki.</li> <li>Niedokładne wymieszanie po dodaniu Odczynnika do Hybrydyzacji M.tuberculosis.</li> <li>Dodawanie zbyt dużej ilości Odczynnika do Selekcji.</li> <li>Przedłużenie etapu Selekcji ponad limit wymaganego czasu.</li> <li>Oziębienie próbek poniżej 42° C po inkubacji w 95°C.</li> <li>Zanieczyszczenie Odczynników do Detekcji.</li> </ul>	<p>Próbki dokładnie wytrzeć wilgotną chusteczką lub ręcznikiem papierowym przed odczytaniem w luminometrze.</p> <p>Sprawdzić temperaturę w łaźni wodnej/ lub bloku grzejnym i dostosować do wymagań zgodnych z procedurą.</p> <p>Dokładnie zwortexować, jak to opisano w etapie 2 (zobacz Hybrydyzacja). Sprawdzić barwę roztworu po zwortexowaniu, powinna być żółta.</p> <p>Sprawdzić pojemność pipety automatycznej.</p> <p>Przestrzegać czasu inkubacji 15 min. w trakcie Selekcji w temp. 60° C.</p> <p>Przenieść próbki z bloku grzejnego o temp. 95° C do łaźni wodnej lub bloku grzejnego o temp. 42° C.</p> <p>Przygotować poziom wody w łaźni wodnej zgodnie z opisem w instrukcji aparatu</p>

**UWAGI**

- Blok grzejny musi mieć otwory dostosowane do rozmiarów próbek 12 X 17 mm. Zalecane jest stosowanie bloku grzejnego.
- Do przechowywania zamrożonego podzielonego na porcje roztworu zaleca się stosowanie zakręcanych mikroprobówek wirówkowych. Indywidualnie zamrożone pojemności mogą być używane po zamrożeniu i rozmrożeniu nie więcej niż jeden raz. Samo-rozmrażające się lodówki nie mogą być używane.
- Do przechowywania zamrożonych pojemności zaleca się stosowanie 5 mL krioprobówek. Indywidualnie zamrożone pojemności mogą być używane po zamrożeniu i rozmrożeniu nie więcej niż jeden raz. Samo-rozmrażające się lodówki nie mogą być używane
- Z powodu różnic wynikających z parametrów sprzętu używanego do mieszania, może być wymagane wydłużenie czasu mieszania w zależności od indywidualnych właściwości aparatu. Należy dostosować szybkość wortexowania, następnie ustawić wortex zgodnie z procedurą opisaną w części UWAGI PRAKTYCZNE pkt. E, następnie pozwolić aby mieszanina reakcyjna osiągnęła wysokość do połowy próbki i tak ją utrzymywać podczas mieszania. Właściwe wymieszanie, jak opisano, jest niezbędne do uzyskania prawidłowego wyniku testu. Czas mieszania może wzrosnąć do 15 sek. bez wpływu na wynik testu.

## LITERATURA

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., Herv  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

**Pomoc techniczna dla klienta:** +1 800 442 9892  
customersupport@hologic.com

**Serwis techniczny:** +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Aby uzyskać więcej informacji, należy odwiedzić [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

Hologic, Amplified MTD, i Leader są znakami towarowymi i/lub zastrzeżony znak towarowy firmy Hologic, Inc. i/lub jej spółek zależnych w Stanach Zjednoczonych i/lub w innych krajach.

Wszelkie inne znaki towarowe znajdujące się w niniejszym dokumencie należą do ich odpowiednich właścicieli.

Opisywany produkt może być objęty co najmniej jednym patentem USA, przedstawionym na stronie [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).



**Hologic N.V.**

Da Vinciiaan 5  
1930 Zaventem  
Belgium

©1995–2018 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.  
AW-12601-3401 Rev. 003 (PL)  
2018-03