

Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direkttest

Packung mit 50 Tests
(bioMerieux Best.Nr. 39006 / Hologic Kat. Nr. 301001)

VERWENDUNGSZWECK.....	2
WARNHINWEISE.....	2
VORSICHTSMASSNAHMEN.....	2
EINFÜHRUNG.....	4
PRINZIP	5
REAGENZIEN (Packung mit 50 Tests)	5
LAGERUNG	6
ENTNAHME, LAGERUNG, TRANSPORT UND VERARBEITUNG DER PROBEN.....	7
Probenentnahme und Lagerung:	7
Transport:.....	7
Verarbeitung (Dekontamination und Konzentration):	7
Lagerung der behandelten Proben:	7
MATERIAL	7
TESTDURCHFÜHRUNG.....	9
Kontrollen.....	9
Gerätevorbereitung	11
Reagenzvorbereitung.....	12
Probenvorbereitung	12
Lysieren der Proben.....	13
Amplifizierung.....	13
Hybridisierung	14
Selektion	14
Detektion	15
Testwiederholung.....	15
HINWEISE.....	16
TESTINTERPRETATION	17
BEFUNDOÜBERMITTLUNG.....	17
LIMITIERUNGEN	18
NORMALWERTE.....	19
PERFORMANCE.....	20
FEHLERSUCHE-UND BESEITIGUNG	23
HINWEISE.....	24
BIBLIOGRAPHIE	25

VERWENDUNGSZWECK

Der Hologic Amplified MTD (Mycobacterium Tuberculosis Direkttest) ist ein Nukleinsäure-Amplifizierungstest für den *in vitro* Nachweis von rRNA aus dem *Mycobacterium tuberculosis* Komplex in Sedimenten, die aus Sputum (induziert oder expektoriert), Bronchialmaterial (Bronchiallavage oder Bronchialaspirate) oder Trachealsekret gewonnen wurden.

WARNHINWEISE

Dieser Test wurde nicht für den direkten Nachweis von *M. tuberculosis* rRNA aus anderen klinischen Proben (z.B. Blut, Urin oder Stuhl) evaluiert. Die Performance des MTD-Tests wurde nur für solche Proben ermittelt, die gemäß den in dieser Packungsbeilage beschriebenen Verfahren gewonnen und gemäß den angegebenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt wurden.

Positive Sedimente müssen kultiviert werden, um festzustellen, ob die Probe neben *M. tuberculosis* Komplex auch atypische Mykobakterien (MOTT) enthält und um eine Resistenztestung durchzuführen. Desweiteren sollten Kulturen angelegt werden, um zu bestimmen, welche *M. tuberculosis* Subspezies (z.B. *M. bovis*) vorliegt.

Obwohl im Verlauf klinischer Evaluierungen auch Probenmaterialien von Kindern, HIV-positiven Patienten und Personen mit MOTT-Infektionen getestet wurden, sind die Gesamtzahlen nicht ausreichend, um daraus schließen zu können, daß es keine statistischen Performanceunterschiede in diesen besonderen Patientengruppen gibt.

Hinsichtlich einer Verlaufskontrolle oder eines Therapieerfolgs bei antituberkulotisch therapierten Patienten wurde der MTD-Test nicht evaluiert.

Für den MTD-Test sollten keine blutigen Untersuchungsmaterialien verwendet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Der MTD weist spezifisch Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplexes nach, d.h. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti* (13). Er ermöglicht jedoch keine Differenzierung innerhalb dieser Spezies. *M. celatum* und *M. terrae*-ähnliche Mykobakterien können zu Kreuzreaktionen führen, wenn sie in Konzentrationen über 30 KBE (Kolonie-bildenden Einheiten) pro Test vorhanden sind. *M. celatum* und *M. terrae*-ähnliche Mykobakterien werden jedoch selten aus klinischen Proben isoliert.
- C. Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, daß die Probe Keime des *M. tuberculosis* Komplex enthält. Die Testergebnisse werden durch Probenentnahme und Transport, Variabilitäten bei der Probenabnahme, technische Fehler des Labors, Fehler bei der Probenidentifikation und durch Fehler bei der Übermittlung der Ergebnisse beeinflusst.
- D. Der Test ist nur für den Nachweis von Spezies des *M. tuberculosis* Komplex aus Proben bestimmt, die gemäß der vom Centers for Disease Control (CDC)⁷ empfohlenen NALC-NaOH oder NaOH Methode behandelt wurden. Dieser Test darf nur mit

konzentrierten Sedimenten aus Sputum (induziert oder expektoriert), Trachealsekreten oder Bronchialmaterial (z.B. Bronchiallavagen, Bronchialaspirationen) verwendet werden. Es muß darauf geachtet werden, daß die Phosphatkonzentration nach der Resuspension der Probe mit Phosphatpuffer 67 mM⁷ beträgt.

- E. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II (bioMerieux Best.Nr. 39300 / Hologic Kat. Nr. 201791) mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.
- F. Beachten Sie bei der Durchführung dieses Tests die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen⁴. Bei der Vorbereitung der Sedimente, sowie bei den einzelnen Arbeitsschritten des MTD-Tests sollten die mikrobiologischen Vorschriften für den Sicherheitsbereich 2 beachtet werden⁵.
- G. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- H. Die Arbeitsflächen, Pipetten und das Material müssen, wie im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“ beschrieben, mit einer 1:1 verdünnten Chlorbleichlösung (ein Teil Bleiche, ein Teil Wasser) dekontaminiert werden. Die Bleichlösung 15 min einwirken lassen und anschließend mit Wasser spülen und abwischen.
- I. Verwenden Sie für die Durchführung dieses Tests Pipetten mit Spitzen, die einen hydrophoben Filter enthalten. Für den Transfer des Lysats aus den Lyseröhrchen in die Amplifizierungsröhrchen müssen extra lange Spitzen mit hydrophobem Filter verwendet werden. Für jedes Reaktionsröhrchen muß eine neue Pipettenspitze verwendet werden. Pipettenspitzen mit Probenmaterial sollten nicht über den Ständer mit den Reaktionsröhrchen geführt werden. Die Pipettenpitzen müssen nach Gebrauch sofort in einen dafür vorgesehenen Abfallbehälter entsorgt werden.
- J. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, achten Sie beim Pipettieren der Reagenzien mit der Repetierpipette bitte darauf, daß nach der Lysatzugabe in die Röhrchen, die Pipettenspitze nicht mit den Röhrchen in Kontakt kommt. Zur Vermeidung von Spritzern sollten die Reagenzien gegen die innere Röhrchenwand pipettiert werden. Vorsichtiges Pipettieren ist wichtig, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- K. Für die Arbeitsschritte vor und nach der Amplifizierung müssen separate Pipetten verwendet werden.
- L. Nach Messung der Proben im Luminometer, dekontaminieren Sie die Röhrchen und entsorgen Sie diese wie im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“ und „ANMERKUNGEN“ beschrieben, um Laborkontaminationen mit Amplifikaten zu vermeiden.
- M. Selbstklebefolien und Stopfen sollten nach dem Abnehmen von den Reaktionsröhrchen sofort in einen dafür vorgesehenen Abfallbehälter entsorgt werden. Sie dürfen AUF KEINEN FALL wiederverwendet werden. Bei der Verwendung von Selbstklebefolie ist darauf zu achten, daß alle Röhrchen gut abgedichtet sind.

- N. Die Wasserbäder während der Inkubationen nicht abdecken, insbesondere wenn Stopfen verwendet werden (Kondenswasser am Deckel ist eine mögliche Quelle für Kontaminationen).
- O. Für die Erzielung akkurater Ergebnisse ist es wichtig, nach der Zugabe des Selektionsreagenzes ausreichend zu vortexen.
- P. Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos durch Amplikons wird empfohlen, den HPA (Hybridization Protection Assay)-Testschritt in einem separaten Arbeitsbereich durchzuführen. Dieser Arbeitsbereich sollte von den Arbeitsplätzen für Proben- und Reagenzvorbereitung sowie der Amplifizierung deutlich getrennt sein.
- Q. Um Laborkontaminationen mit Amplikons zu vermeiden, sollten die Arbeitsabläufe in einer Richtung organisiert sein, z.B. von der Proben- und Reagenzvorbereitung zur Amplifizierung und anschließend zum HPA. Proben, Geräte und Reagenzien sollten nicht wieder in einen Bereich zurückgebracht werden, in denen ein vorheriger Arbeitsschritt durchgeführt wurde. Desweiteren sollte das Laborpersonal nicht in vorherige Arbeitsbereiche zurückgehen, ohne entsprechende Sicherheitsmaßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen getroffen zu haben. Es wird dringend empfohlen, die Laminar Flow Box, die für die Probenbehandlung verwendet wurde, nicht zur Durchführung des MTD Tests zu verwenden.

EINFÜHRUNG

Der MTD-Test verwendet die Techniken TMA (Transcription-Mediated Amplification) und HPA (Hybridization Protection Assay)² zum qualitativen Nachweis von ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA) von Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplexes. Der MTD-Test weist sowohl die rRNA von kultivierbaren als auch von nicht kultivierbaren Organismen nach. Der *M. tuberculosis* Komplex umfaßt die Subspezies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti* (12, 13). Der MTD-Test weist alle Mikroorganismen des *M. tuberculosis* Komplex nach. *M. microti* ist nur für Tiere infektiös, *M. bovis* wird selten vom Tier auf den Menschen übertragen und *M. africanum* ist für die Lungentuberkulose im tropischen Afrika verantwortlich¹². *M. tuberculosis* ist der häufigste Erreger, der Tuberkulose. Das CDC hat kürzlich über einen Anstieg der Tuberkulose-Inzidenz bei AIDS-Patienten und Einwanderern und über eine Zunahme der Krankheitsübertragungen innerhalb von Hochrisikogruppen berichtet^{6,9}. Außerdem wird ein Anstieg der Ausbildung von resistenten bzw. multiresistenten Stämme gegenüber Antituberkulotika beobachtet¹¹. Die Konsequenzen im Bereich der öffentlichen Gesundheit sind beträchtlich.

Konventionelle Kulturmethode können das Wachstum von Tuberkulose-Bakterien innerhalb von 1 bis 8 Wochen nachweisen^{7,10}. Der MTD-Test dagegen ermöglicht den rRNA Nachweis von Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplexes innerhalb von 2,5 bis 3,5 Stunden. Auch wenn der MTD-Test keine Aussage hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen Antibiotika macht, so weist er doch *M. tuberculosis* zuverlässig und schnell nach. Dadurch könnten die Isolierstationen der Krankenhäuser besser eingesetzt und schneller mit einer adäquaten Therapie begonnen werden. Die Isolierung von möglicherweise infizierten Kontaktpersonen könnte rechtzeitig vorgenommen werden³.

PRINZIP

Der MTD-Test ist ein Test, bei dem Amplifizierung und Detektion in ein und demselben Röhrchen durchgeführt werden. Zunächst werden die Nukleinsäuren der Mykobakterien durch Ultraschall freigesetzt. Unter Hitzeeinwirkung werden die Nukleinsäuren denaturiert und die Sekundärstruktur der rRNA aufgebrochen. Mittels der TMA Methode wird dann bei einer konstanten Temperatur von 42°C ein spezifischer Abschnitt der Mykobakterien rRNA amplifiziert. Dabei kommt es in einem Zwischenschritt durch Transkription zur Bildung von DNA, aus der wiederum sehr viele RNA Amplikons gebildet werden.

Die *M. tuberculosis* Komplex spezifischen Sequenzen der rRNA Amplikons werden anschließend mit der HPA Methode nachgewiesen². Das Mycobacterium Tuberculosis-Hybridisierungsreagenz enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemiluminiszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist zu den *M. tuberculosis* spezifischen Sequenzen komplementär. Die Sonde bildet mit diesen spezifischen Sequenzen stabile RNA-DNA Hybride. Nach einem Selektionsschritt wird das von den hybridisierten Sonden abgegebene Lichtsignal mit dem Leader™ Luminometer detektiert.

REAGENZIEN (Packung mit 50 Tests)

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

Die Reagenzien des MTD-Tests werden folgendermaßen angeboten:

Reagenz-Bezeichnung	Volumen
Probenverdünnungspuffer (SDB) <i>Tris-Pufferlösung mit < 3 % Detergenz</i>	1 x 2,5 ml
Amplifizierungsreagenz (A) <i>Lyophilisierte Nukleinsäuren in Tris Pufferlösung mit 5 % Bindemittel</i>	1 x 3 ml (nach Auflösung)
Amplifizierungspuffer (AB) <i>Wässrige Lösung mit Konservierungsstoffen</i>	1 x 3 ml
Ölreagenz (O). <i>Silikonöl</i>	1 x 10 ml
Enzymreagenz (E) <i>Reverse Transkriptase und RNA-Polymerase, lyophilisiert, in HEPES-Pufferlösung mit < 10 % Bindemittel und ≥15 mM N-Acetyl-L-Cystein</i>	1 x 1,5 ml (nach Auflösung)
Enzymverdünnungspuffer (EDB) <i>Tris Pufferlösung mit oberflächenaktiver Substanz und Glycerin</i>	1 x 1,5 ml

HYBRIDISIERUNGS-REAGENZIE

Reagent Name	Volumen
Hybridisierungsreagenz (H) <i>Nicht-infektiöse Chemilumineszenz-markierte DNA-Sonde, < 100 ng/Ampulle, lyophilisiert, in Succinat-Pufferlösung mit Bindemittel und Detergenz</i>	1 x 6 ml (nach Auflösung)
Hybridisierungspuffer (HB) <i>Succinat-Pufferlösung mit < 4 % Detergenz</i>	1 x 6 ml
Selektionsreagenz (S) <i>Borat-Pufferlösung mit oberflächenaktiver Substanz</i>	1 x 15 ml
Lyseröhrchen (LT) <i>Glaskügelchen, Bindemittel</i>	2 x 25 Röhrchen

LAGERUNG

A. Die folgenden Lösungen bzw. nicht gelösten Bestandteile müssen bei 2° - 8°C gelagert werden und sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar:

- Probenverdünnungspuffer (SDB)
- Amplifizierungsreagenz (A)
- Amplifizierungspuffer (AB)
- Enzymreagenz (E)
- Enzymverdünnungspuffer (EDB)
- Hybridisierungsreagenz (H)

Das *aufgelöste* Amplifizierungsreagenz (A) ist 2 Monate bei 2° - 8°C haltbar. Das Hybridisierungsreagenz (H) und das Enzymreagenz (E) sind nach der Auflösung 1 Monat bei 2° - 8°C haltbar oder 2 Monate bei einer Temperatur ≤ -20°C, wenn sie am Tag der Auflösung portioniert und eingefroren werden. Die eingefrorenen Aliquots müssen an dem Tag, an dem sie aufgetaut werden, verbraucht werden. Tiefkühlgeräte mit automatischer Abtauvorrichtung dürfen nicht verwendet werden.

B. Folgende Bestandteile müssen bei 2° - 25°C gelagert werden und sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar:

- Ölreagenz (O)
- Hybridisierungspuffer (HB)
- Selektionsreagenz (S)
- Lyseröhrchen (LT)

ENTNAHME, LAGERUNG, TRANSPORT UND VERARBEITUNG DER PROBEN**Probenentnahme und Lagerung:**

Die Proben müssen in sterilen Plastikbehältern gesammelt und bis zum Transport bzw. bis zur Verarbeitung bei 2° - 8°C gelagert werden. Die für klinische Studien verwendeten Proben wurden bis zur Verarbeitung nicht länger als 4 Tage gelagert (im allgemeinen weniger als 24 Stunden).

Transport:

Die Proben sollten so schnell wie möglich ins Labor gebracht werden.

Verarbeitung (Dekontamination und Konzentration):

Stark bluthaltige Materialien sollten nicht mit dem MTD-Test getestet werden. Dieser Test ist für den Nachweis der rRNA von Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplex in solchen Proben bestimmt, die gemäß den allgemein anerkannten Verfahren mit NALG-NaOH oder NaOH (mit 1 % bis 1,5 % NaOH) 15 bis 20 min dekontaminiert und bei $\geq 3000 \times g$ zentrifugiert wurden⁷.

Lagerung der behandelten Proben:

Das Sediment kann vor der Testung bis zu 3 Tage bei 2° - 8°C gelagert werden. Bei -20°C oder -70°C kann es bis zu 6 Monate gelagert werden. Tiefkühlgeräte mit automatischer Abtauvorrichtung dürfen nicht verwendet werden.

MATERIAL**A. Lieferumfang**

AMPLIFIZIERUNGSREAGENZEN	
Packungsinhalt (<i>bioMérieux Best.Nr. 39006 / Hologic Kat. Nr. 301001</i>)	50 Tests
Probenverdünnungspuffer (SDB)	1 x 2,5 ml
Amplifizierungsreagenz (A)	1 x 3 ml (nach Auflösung)
Amplifizierungspuffer (AB)	1 x 3 ml
Ölreagenz (O)	1 x 10 ml
Enzymreagenz (E)	1 x 1,5 ml (nach Auflösung)
Enzymverdünnungspuffer (EDB)	1 x 1,5 ml

HYBRIDISIERUNGSREAGENZIE

Packungsinhalt (<i>bioMérieux Best.Nr. 39006 / Hologic Kat. Nr. 301001</i>)	50 Tests
Hybridisierungsreagenz (H)	1 x 6 ml (nach Auflösung)
Hybridisierungspuffer (HB)	1 x 6 ml
Selektionsreagenz (S)	1 x 15 ml
Lyseröhrchen (LT)	2 x 25 Röhrchen
Selbstklebefolien	1 Packung

B. Zusätzlich erforderliches Material:

- Mikropipetten für 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl und 450 µl
- Repetierpipette
- Vortex
- Steriles Wasser (filtriert oder autoklaviert)
- Kulturröhrchen
- Sterile Glaskügelchen 3 mm
- Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß
- Ständer für Reaktionsröhrchen
- Pipettenspitzen mit Filter (1 000 µl)
- Positive Amplifizierungskontrolle (z.B. *M. tuberculosis*, ATCC 25177 oder ATCC 27294)
- Negative Amplifizierungskontrollen (z.B. *M. gordonae*, ATCC 14470 oder *M. terrae*, ATCC 15755)
- Bleichlösung (Hypochloritlösung 5,25 %)
- Plastik-Abdeckfolien für die Arbeitsflächen

C. Zusätzlich lieferbare Materialien:

	Hologic Kat.Nr.
Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39409</i>)	901104
Heizblöcke (42° ± 1°C, 60° ± 1°C, and 95° ± 5°C) ^A (<i>bioMérieux Best.Nr. 39405, 39406, 39407</i>)	105524,105524F,105524J
Leader 50i Luminometer (<i>bioMérieux Best.Nr. 39400</i>)	103100i
Detektionsreagenzien-Kit (<i>bioMérieux Best.Nr. 39300</i>)	201791
MTD Amplifizierungskontrollen (<i>bioMérieux Best.Nr. 39223</i>)	301043F
Röhrchenständer für das Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39313</i>)	104027
Ständer für Reaktionsröhrchen (<i>bioMérieux Best.Nr. 39311</i>)	104769
Lange Pipettenspitzen mit Filter (1250 µl) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39315</i>)	104316
Polypropylenröhrchen, 12 x 75 mm (<i>bioMérieux Best.Nr. 39308</i>)	102440
Polypropylenstopfen für Röhrchen mit 12 x 75 mm (<i>bioMérieux Best.Nr. 39320</i>)	400713

TESTDURCHFÜHRUNG**Kontrollen**

Die Stämme für die Amplifizierungs-Positivkontrolle müssen zum *M. tuberculosis* Komplex gehören, wie z.B. der avirulente H37Ra (ATCC 25177) Stamm oder der virulente H37Rv (ATCC 27294) Stamm. Die Stämme für die Negativkontrolle sollten zu den atypischen Mykobakterien (MOTT) gehören, z.B. *M. goodii* (ATCC 14470) oder *M. terrae* (ATCC 15755). Die Kontrollen müssen vor der Testung der Probe vorbereitet sein.

Die Kontrollen müssen 25 - 150 KBE pro 50 µl enthalten, so dass eine Endkonzentration von 1 - 10 KBE pro Test erreicht wird. Diese Konzentration sollte kulturell überprüft werden. Diese Kontrollen werden für die Vorbereitung der Probenbehandlungskontrollen verwendet (siehe Probenvorbereitung).

1. Empfohlenes Verfahren zur Vorbereitung der Kontrollen
 - a. Geben Sie 3 bis 5 sterile Glaskügelchen (Durchmesser 3 mm) in ein sauberes Kulturröhrchen.
 - b. 1 bis 2 ml steriles Wasser zugeben. Nehmen Sie mehrere Impfösen (1 µl) von der entsprechenden Kultur ab und geben Sie diese in das vorbereitete Röhrchen. Das Röhrchen verschließen und mehrmals bei hoher Geschwindigkeit vortexen.
 - c. Suspension für 15 min stehen lassen.
 - d. Überführen Sie den Überstand in ein sauberes Kulturröhrchen. Stellen Sie die Trübung mit einem Nephelometer auf McFarland Standard 1 ein.
 - e. Verdünnen Sie die Suspension 1:100, indem Sie 100 µl der auf McFarland 1 eingestellten Suspension in 10 ml steriles Wasser geben. Das Röhrchen verschließen und vortexen. Dies ist die Verdünnung 1.
 - f. Anschließend eine zweite 1:100 Verdünnung herstellen. Geben Sie hierfür 100 µl der Verdünnung 1 in 10 ml steriles Wasser. Das Röhrchen verschließen und vortexen. Dies ist die Verdünnung 2. Diese Verdünnung sollte ca. 25 - 150 KBE pro 50 µl enthalten.

Portionierung und Lagerung der Kontrollen

- a. Die Verdünnungen müssen á 500 µl in saubere 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß pipettiert werden. Diese Aliquots sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt und können 6 Monate bei -20°C oder 1 Jahr bei -70°C aufbewahrt werden. Verwenden Sie kein Tiefkühlgerät mit automatischer Abtauvorrichtung.

Die Testung der empfohlenen *M. tuberculosis* Positivkontrolle dient nur zum Nachweis eines wesentlichen Qualitätsverlustes der Reagenzien. Mit der Positivkontrolle wird die Einwirkung durch überschüssiges NaOH und Phosphatpuffer auf die Reagenzien kontrolliert. Zeit- und Temperaturschwankungen im Test, welche die Amplifizierung oder Selektionszeit beeinflussen, können mit der empfohlenen Kontrolle nicht nachgewiesen werden. Weitere Kontrollen können den Richtlinien oder besonderen Anforderungen entsprechend getestet werden.

2. Inhibitionskontrollen

Bei negativem MTD-Testergebnis und gleichzeitigem starken klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer Tuberkulose besteht die Möglichkeit, die Probe auf Inhibitoren zu untersuchen. Gehen Sie hierfür folgendermaßen vor:

- a. 50 µl des Probenverdünnungspuffers in 2 Mykobakterien Lyseröhrchen (LT) pipettieren (angereichert und nicht angereichert).
- b. In ein Röhrchen 50 µl der Positivkontrolle und 450 µl der Probe geben (angereicherte Probe). In das zweite Röhrchen nur 450 µl Probe pipettieren (nicht angereichert). Führen Sie den MTD-Test wie gewohnt durch.

Interpretation

Beträgt der RLU Wert (Relative Light Units) in der angereicherten Probe ≥ 30.000 RLU, enthält die Probe keinen Amplifizierungsinhibitor und offensichtlich keine Zielsequenz für die Amplifikation. Liegt der RLU Wert der angereicherten Probe unter 30.000 RLU, enthält die Probe einen Amplifizierungsinhibitor. Fordern Sie in diesem Fall neues Untersuchungsmaterial an. Ergibt sich bei der erneuten Testung der nicht angereicherten Probe ein positives Ergebnis, kann das MTD-Ergebnis als positiv bewertet werden. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Reaktionstyp sind Schwankungen bei der Probengewinnung; d.h. im Gegensatz zur zweiten Probe enthielt die erste Probe keine Zielsequenz für die Amplifikation. Der RLU-Wert der nicht angereicherten Probe kann entweder positiv oder negativ sein, abhängig davon, ob das verwendete Aliquot aus dem Sediment *M. tuberculosis* Komplex rRNA enthielt oder nicht.

3. Kontaminationskontrolle des Labors

Zur Überprüfung des Labors auf Kontamination mit *M. tuberculosis* Amplikons sollte folgendes Verfahren angewendet werden:

- a. Geben Sie 1 ml steriles Wasser in ein sauberes Röhrchen. Befeuchten Sie einen sterilen Wattetupfer aus Polyester oder Dacron mit sterilem Wasser.
- b. Wischen Sie mit diesem Tupfer über den Labortisch oder die verwendeten Geräte.
- c. Den Tupfer in das Röhrchen geben und sorgfältig mischen. Den Tupfer herausnehmen und an der Röhrchenwand ausdrücken. Verwerfen Sie den Tupfer in einem Behälter, der 1:2 verdünnte Bleichlösung (1 Teil Bleiche, 1 Teil Wasser) enthält.
- d. 25 μ l der so erhaltenen Lösung in ein Amplifizierungsröhrchen geben, das 50 μ l Amplifizierungsreagenz und 200 μ l Ölreagenz enthält.
- e. Folgen Sie den Anleitungen im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“.

Interpretation

Bei Ergebnissen ≥ 30.000 RLU ist die Oberfläche kontaminiert und muß mit Bleichlösung dekontaminiert werden, wie im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG: Vorbereitung des Materials“ angegeben. Bei Verdacht auf eine Kontamination des Wasserbads, testen Sie 25 μ l Wasser aus dem Wasserbad wie oben beschrieben, vorausgesetzt das Wasserbad enthält keine Antiseptika.

Gerätevorbereitung

1. Für eine optimale Energieübertragung im Ultraschallbad muß das Wasser vor jedem Betrieb des Gerätes entgast werden:
 - a. Füllen Sie das Ultraschallbad bis ca. 1 cm unter den Rand mit Leitungswasser bei Raumtemperatur.
 - b. Schalten Sie das Ultraschallbad für 15 min. ein, um das Wasser zu entgasen.

2. Einen Heizblock auf 95°C, einen Heizblock oder ein Wasserbad auf 60° ± 1°C und einen Heizblock oder ein Wasserbad auf 42° ± 1°C einstellen.
3. Vor der Testdurchführung müssen die Arbeitsflächen, das Material und die Pipetten mit einer 1:2 verdünnten Bleichlösung (1 Teil Bleiche, 1 Teil Wasser) gereinigt werden. Die Bleichlösung sollte mindestens 15 min. einwirken. Die Arbeitsfläche zur Entfernung der Bleichlösung mit Wasser abspülen. Die Oberfläche, auf der der Test durchgeführt wird, mit einer Plastikunterlage abdecken.
4. Das Leader Luminometer vorbereiten. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung des Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist und die Schläuche angeschlossen sind. Zum Nachfüllen der Detektionsreagenzien beachten Sie bitte die Hinweise im Handbuch des Luminometers (diese Reagenzien sind separat zu beziehen).

Reagenzvorbereitung

Das Amplifizierungsreagenz (A) (50 Tests) mit 3 ml Amplifizierungspuffer (AB) aufnehmen. Vortexen bis das Reagenz gelöst ist. Das *aufgelöste* Reagenz solange bei Raumtemperatur stehen lassen, bis die Lösung klar wird. Das aufgelöste Amplifizierungsreagenz ist bei 2°- 8°C 2 Monate haltbar. Vor Gebrauch sollte die Lösung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Probenvorbereitung

1. Beschriften Sie eine ausreichende Zahl an Mycobacterium Lyseröhrchen (LT) für die Testung der Proben und entweder jeweils ein Röhrchen für die Amplifizierungs-Positivkontrolle bzw. -Negativkontrolle oder die Positiv-bzw. Negativkontrolle für die Probenbehandlung. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
2. Pipettieren Sie 50 µl Mycobacterium Probenverdünnungspuffer (SDB) in alle Mycobacterium Lyseröhrchen (LT). Gehen Sie gemäß den folgenden Anweisungen (A oder B für die Kontrollen und C für die Proben) vor.
 - A. Kontrollen für die Probenbehandlung:

Pipettieren Sie für jede Kontrolle 1 ml der NALC/NaOH Lösung und 3 ml des Phosphatpuffers, die für die Behandlung des Sputums verwendet wurden, mit 1 ml sterilem Wasser in ein Probenbehandlungsröhrchen.

 - I. Vortexen.
 - II. Überführen Sie 450 µl der NALC/NaOH/Phosphatpuffer Lösung und 50 µl Kontrollverdünnung in die entsprechend beschrifteten Mycobacterium Lyseröhrchen (LT).
 - B. Testung der Amplifizierungskontrollen: Überführen Sie 450 µl Amplifizierungskontrolle in die entsprechend beschrifteten Mycobacterium Lyseröhrchen (LT).

- C. Proben: Überführen Sie 450 µl dekontaminierte gut gevortexte Probe in die entsprechend beschrifteten Mycobacterium Lyseröhrchen (LT).
3. Verschließen Sie die Mycobacterium Lyseröhrchen (LT) nach Zugabe jeder Probe.
4. Vortexen Sie 3 Sekunden.

Lysieren der Proben

1. Die Lyseröhrchen in den Röhrchenständer des Ultraschallbads stellen, so daß das Probenmaterial am Boden der Röhrchen ins Wasser eintaucht, die Deckel jedoch über dem Wasser sind. **DIE RÖHRCHEN DÜRFEN DEN BODEN ODER DIE WÄNDE DES ULTRASCHALLBADS NICHT BERÜHREN.**
2. Die Proben für 15 min beschallen, jedoch nicht länger als 20 min. Die so behandelten Proben und Kontrollen werden nun als Lysate bezeichnet. **LYSATE NICHT VORTEXEN.**

Amplifizierung

1. Beschriften Sie die Amplifizierungsröhrchen (Propylenröhrchen, 12 x 75 mm) am oberen Rand entsprechend der Numerierung der Lyseröhrchen (LT). Markieren Sie auch die Amplifizierungsröhrchen für die Positiv- und Negativkontrolle Wenn RNA-Kontrollen eingesetzt werden, beschriften Sie die entsprechenden Amplifizierungsröhrchen als Positiv- bzw. Negativkontrollen.
2. Pipettieren Sie 50 µl des *aufgelösten* Amplifizierungsreagenzes mit einer Repetierpipette auf den Boden der Amplifizierungsröhrchen. Anschließend mit einer Repetierpipette in jedes Amplifizierungsröhrchen 200 µl Öreagenz (O) pipettieren.
3. **LYSATE NICHT VORTEXEN.** 25 µl Lysat auf den Boden der entsprechenden beschrifteten Amplifizierungsröhrchen pipettieren. Verwenden Sie für jedes Lysat eine neue lange Pipettenspitze mit hydrophobem Filter. Übrig gebliebenes Lysat kann für 7 Tage bei 2°- 8°C aufbewahrt oder 1 Monat bei einer Temperatur ≤ -20°C eingefroren werden. Tiefkühlgeräte mit automatischer Abtauvorrichtung dürfen nicht verwendet werden. Wenn das Lysat für weitere Tests benötigt wird, sollte es vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. **LYSATE NICHT VORTEXEN .**
4. Die Röhrchen im Heizblock bei 95°C für 15 min inkubieren, jedoch nicht länger als 20 min.
5. Herstellung der Enzymlösung: Lösen Sie das lyophilisierte Enzymreagenz (E) mit 1,5 ml Enzymverdünnungspuffer (EDB). Leicht mischen. **NICHT VORTEXEN.** Das *aufgelöste* Enzymreagenz ist 1 Monat bei 2°- 8°C haltbar oder 2 Monate bei ≤ -20°C, wenn es am Tag der Rekonstitution portioniert und eingefroren wird. Wenn Sie den Test mit eingefrorenen Enzymaliquots durchführen, sollten diese vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden; die Aliquots^B nicht durch Inkubieren bei hohen Temperaturen auftauen. Die aufgetauten Aliquots sollten vor der Zugabe in die Amplifizierungsröhrchen mit einer Repetierpipette durch vorsichtiges Aspirieren und wieder Abgeben homogenisiert werden.

6. Die Röhrchen bei $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in den Heizblock oder das Wasserbad stellen und 5 min abkühlen lassen. DIE RÖHRCHEN NICHT AUF RAUMTEMPERATUR ABKÜHLEN LASSEN UND DAS WASSERBAD NICHT ABDECKEN.
7. Nach Abkühlung der Röhrchen auf $42^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ geben Sie in jedes Röhrchen mit einer Repetierpipette 25 μl Enzymreagenz. Die Röhrchen durch leichtes Schütteln mischen. Inkubieren Sie bei 42°C für 30 min, jedoch nicht länger als 60 min. Für diesen Inkubationsschritt sollten Selbstklebefolien oder Stopfen verwendet werden. DAS WASSERBAD NICHT ABDECKEN.
8. Nach 30-minütiger Inkubation können die abgedeckten Röhrchen bei $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$ 2 Stunden oder bei -20°C bis zum nächsten Tag aufbewahrt werden. Nach einer Lagerung bei -20°C müssen die Amplifizierungsröhrchen vor der Hybridisierung vollständig aufgetaut werden (bei Raumtemperatur oder bei einer Temperatur von maximal 60°C). Die Röhrchen sollten in diesem Fall besser nicht mit Selbstklebefolie sondern mit den Stopfen abgedeckt werden.

Hybridisierung

1. Das lyophilisierte Hybridisierungsreagenz (H) mit 6 ml Hybridisierungspuffer (HB) aufnehmen. Das Hybridisierungsreagenz (H) und der Hybridisierungspuffer (HB) müssen vor der Rekonstitution auf Raumtemperatur gebracht werden. Gekühltes Hybridisierungsreagenz (HB) sollte vor Gebrauch unter vorsichtigem Schütteln auf eine Temperatur von 60°C gebracht werden, um zu gewährleisten, daß alle Bestandteile gelöst sind. Die Lösung solange vortexen, bis sie klar wird (dies kann bis zu 1 Min. dauern). Die Haltbarkeit des aufgelösten Hybridisierungsreagenzes beträgt 1 Monat bei $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$ oder 2 Monate bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$, wenn es am Tag der Auflösung portioniert^C und eingefroren wird. Wenn das *aufgelöste* Hybridisierungsreagenz gekühlt oder eingefroren wurde, erwärmen Sie es vor Gebrauch unter vor-sichtigem Schütteln auf 60°C , um zu gewährleisten, daß alle Bestandteile gelöst sind.
2. 100 μl *aufgelöstes* Hybridisierungsreagenz mit einer Repetierpipette in jedes Röhrchen pipettieren. Die Röhrchen mit Selbstklebefolien oder Stopfen abdecken. Vortexen Sie die Röhrchen anschließend bei mittlerer Geschwindigkeit 3 Mal für **mindestens** 1 Sekunde^D. Um eine gute Homogenisierung des Reaktionsmediums zu **erreichen**, sollten die Röhrchen aufrecht stehen und die Reaktionsmischung während des Schüttelvorgangs sollte die obere Hälfte der Röhrchen erreichen (um Kontaminationen zu vermeiden, sollte die Reaktionsmischung nicht mit den Selbstklebefolien bzw. Stopfen in Kontakt kommen). Nach der Homogenisierung sollte die Reaktionsmischung eine einheitlich gelbe Farbe aufweisen.
3. Inkubieren Sie im Heizblock oder Wasserbad bei 60°C für 15 min, jedoch nicht länger als 20 min.

Selektion

1. Das Selektionsreagenz (S) muß vor der Testung auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Röhrchen aus dem 60°C Wasserbad oder dem Heizblock nehmen und mit einer Repetierpipette 300 μl Selektionsreagenz (S) zugeben. Die Röhrchen mit Selbstklebefolie oder Stopfen abdecken. Vortexen Sie die Röhrchen anschließend

- bei mittlerer Geschwindigkeit 3 Mal für **mindestens** 1 Sekunde^D. Um eine gute Homogenisierung des Reaktionsmediums zu erreichen, sollten die Röhrrchen aufrecht stehen und die Reaktionsmischung sollte während des Schüttelvorgangs die obere Hälfte des Röhrrchens erreichen (um Kontaminationen zu vermeiden, sollte die Reaktionsmischung nicht mit den Selbstklebefolien bzw. Stopfen in Kontakt kommen). Nach der Homogenisierung sollte die Reaktionsmischung eine einheitlich rosa Farbe aufweisen.
2. Inkubieren Sie im Heizblock oder Wasserbad bei 60°C für 15 min, jedoch nicht länger als 16 min.
 3. Die Röhrrchen aus dem Wasserbad oder dem Heizblock nehmen. Mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 1 Stunde auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Selbstklebefolien bzw. Stopfen kurz vor der Detektion abnehmen.

Detektion

1. Wählen Sie auf dem Luminometer das geeignete Programm mit einer Ablesezeit von 2 Sekunden.
2. Zur Säuberung der Röhrrchenaußenwand, sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrrchenmaterial selbst, sollten diese vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrrchen gemäß den Angaben im Handbuch in das Luminometer. Die Röhrrchen müssen innerhalb einer Stunde nach der Selektion gemessen werden.
3. Nehmen Sie die Röhrrchen nach der Messung aus dem Luminometer.
4. Nach dem Ablesen füllen Sie die Röhrrchen vorsichtig mit einer 1:10 verdünnten Bleichlösung (1 Teil Bleiche, 9 Teil Wasser) aus einer Waschflasche. Die Bleichlösung mindestens 1 Stunde einwirken lassen, bevor Sie die Röhrrchen verwerfen, um Kontaminationen des Labors mit Amplikons zu vermeiden.
5. Die Röhrrchenständer müssen zur Dekontamination mindestens 15 min vollständig in 1:2 verdünnte Bleichlösung getaucht (1 Teil Bleiche, 1 Teil Wasser) werden. Die Ständer danach mit Wasser abspülen und abtrocknen oder an der Luft trocken lassen.
6. Labor und Material mit einer 1:2 (1 Teil Bleiche, 9 Teil Wasser) verdünnten Bleichlösung dekontaminieren.

Testwiederholung

1. Wenn der Test wiederholt werden muß, sollten die Lysate auf Raumtemperatur gebracht werden. LYSATE NICHT VORTEXENI.
2. Gehen Sie gemäß den im Abschnitt TESTDURCHFÜHRUNG beschriebenen Schritten vor und beginnen Sie mit der Amplifizierung.

HINWEISE

A. Reagenzien

1. Das Enzymreagenz darf nach der Auflösung nicht länger als 15 min bei Raumtemperatur stehen bleiben.
2. Im Hybridisierungspuffer (HB) können sich Präzipitate bilden. Zur Auflösung des Niederschlags, den Hybridisierungspuffer (HB) oder das aufgelöste Hybridisierungsreagenz auf 60°C erhitzen und schütteln.

B. Temperatur

1. Die Amplifizierung, Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen; die Temperatur der verwendeten Heizsysteme (Heizblock oder Wasserbad) muß deshalb präzise im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
2. Vor Zugabe des Enzymreagenzes die Röhrchen 5 min abkühlen lassen, so daß sie eine Temperatur von 42°C erreichen. Die Amplifizierungsreaktion verläuft bei dieser Temperatur optimal.
3. Das Einhalten der Temperatur ist für die Amplifizierungsphase von entscheidender Bedeutung (42° ± 1°C).

C. Zeit

Die im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“ angegebenen Zeiten müssen unbedingt eingehalten werden.

D. Wasserbad

1. Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so daß die gesamte Reaktionslösung im Wasser steht, es muß jedoch darauf geachtet werden, daß kein Wasser von oben in die Röhrchen eindringen kann.
2. Während der Amplifizierung darf das Wasserbad nicht abgedeckt werden, um Kondensationen auf oder in den Röhrchen zu vermeiden.

E. Vortexen

Bitte achten Sie unbedingt darauf, daß das Reaktionsgemisch für die Hybridisierung und die Selektion absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe des aufgelösten Hybridisierungsreagenzes (H) (die Mischung wird einheitlich gelb) und des Selektionsreagenzes (S) (die Mischung wird einheitlich rosa).

Durch Vortexen erhält man homogene Suspensionen. Wenn Reagenzien in ein Reaktionsröhrchen gegeben werden und einer externen Kraft ausgesetzt werden, findet eine schnelle Rotation der Lösung um die Achse des Röhrchens statt. Dadurch entsteht eine homogene Suspension. Um eine korrekte Homogenisierung auf dem Vortex zu erreichen, müssen die Röhrchen in aufrechter, senkrechter Position gehalten werden. Das Reaktionsgemisch muß während des Schüttelvorgangs die obere Hälfte der

Röhrchen erreichen. Während des Hybridisierungs- und des Selektionsschrittes wird dieser Mischvorgang 3 Mal in Folge für jeweils **mindestens** 1 Sekunde durchgeführt.

TESTINTERPRETATION

Die Ergebnisse des Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Tests (MTD) werden auf der Basis eines negativen (< 30.000 RLU), eines positiven (≥ 500.000 RLU) oder eines zweifelhaften Erstbefundes (30.000 bis 499.999 RLU) interpretiert. Bei zweifelhaften Ergebnissen sollte der MTD Test mit dem verbliebenen Lysat wiederholt werden. Ist das Ergebnis des wiederholten Tests > 30.000 RLU gilt die Probe als positiv.

A. Qualitätskontrolle und Validierung der Ergebnisse

Die Kontrollen sollten folgende Werte ergeben:

- Amplifizierungs-Negativkontrolle < 20.000 RLU
- Amplifizierungs-Positivkontrolle ≥ 500.000 RLU
- Negativkontrolle Probenbehandlung < 20.000 RLU
- Positivkontrolle Probenbehandlung ≥ 1.000.000 RLU

Wenn die Werte der MTD Kontrollen nicht in den oben genannten Sollbereichen liegen, dürfen die Ergebnisse der Patientenproben nicht verwendet werden. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Abschnitt FEHLERSUCHE.

Jedes Labor sollte aus den Ergebnissen der einzelnen Kontrollserien seine eigenen Sollwerte für die Kontrollen festlegen.

B. Ergebnisse der Patientenproben

Bei einer Abweichung der Kontrollen von den Sollwerten, können die Ergebnisse der Patientenproben aus dieser Testserie nicht verwendet werden.

Ergebnisse:

- ≥ 500.000 RLU positiv für *M. tuberculosis* Komplex rRNA
- < 30.000 RLU negativ für *M. tuberculosis* Komplex rRNA
- 30.000 bis 499.999 RLU wahrscheinlich positiv für *M. tuberculosis* Komplex rRNA, wiederholen Sie den Test, um die Ergebnisse zu überprüfen:

Testwiederholung: ≥ 30.000 RLU: positiv für *M. tuberculosis* Komplex rRNA

Testwiederholung < 30.000 RLU: negativ für *M. tuberculosis* Komplex rRNA

BEFUNDOÜBERMITTLUNG

Die Ergebnisse des MTD Tests sollten in Zusammenhang mit anderen verfügbaren Laborergebnissen und unter Berücksichtigung der Klinik des Patienten interpretiert werden. In Abhängigkeit des Grades des klinischen Verdachtes sollte die Testung einer weiteren Probe in Erwägung gezogen werden.

Wenn das Ergebnis des ersten MTD Tests mit ≥ 500.000 RLU oder der wiederholte MTD Test mit > 30.000 RLU positiv ist, protokollieren Sie das Ergebnis wie folgt:

Befund:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex rRNA nachgewiesen. Direktpräparat auf säurefeste Stäbchen (positiv oder negativ).
Zusatz-information	Das Kulturendergebnis liegt noch nicht vor. Die Probe kann sowohl MOTT und <i>M. tuberculosis</i> oder nur <i>M. tuberculosis</i> enthalten. Dieser Test sollte nicht die einzige Grundlage für die Diagnose einer Tuberkulose sein. Der positive Vorhersagewert (PPV) für einen Kultur-negativen Patienten ist geringer als der für einen Kultur-positiven Patienten. Dies ist besonders wichtig für Testpopulationen, in denen die Tuberkulose-Prävalenz gering und der positive Vorhersagewert für diagnostische Verfahren entsprechend reduziert ist.

Wenn das Ergebnis des ersten oder des wiederholten MTD Tests mit < 30.000 RLU negativ ist, protokollieren Sie das Ergebnis wie folgt:

Befund:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex rRNA nicht nachgewiesen. Direktpräparat auf säurefeste Stäbchen (positiv oder negativ).
Zusatz-information:	Keine <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex rRNA nachgewiesen. Das Kulturendergebnis liegt noch nicht vor. Die Probe enthält wahrscheinlich keine <i>M. tuberculosis</i> Bakterien. Das Ergebnis kann aber aufgrund zu geringer <i>M. tuberculosis</i> Keimzahlen in An- oder Abwesenheit von atypischen Mykobakterien falsch negativ sein. Ebenso können Inhibitoren in der Probe zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Bei klinischem Verdacht auf eine aktive Tuberkulose oder auf Vorliegen von Inhibitoren in der Probe ist die Testung einer weiteren Patientenprobe empfehlenswert.

LIMITIERUNGEN

Der Test ist nur für den Nachweis von Spezies des *M. tuberculosis* Komplex aus Proben bestimmt, die gemäß der vom Centers for Disease Control (CDC)⁷ empfohlenen NALC-NaOH oder NaOH Methode behandelt wurden. Dieser Test darf nur mit konzentrierten Sedimenten aus Sputum (induziert oder expektoriert), Trachealsekreten oder Bronchialmaterial (z.B. Bronchiallavagen, Bronchialaspirationen) verwendet werden.

Der MTD-Test erfasst spezifisch Mykobakterien des *M. tuberculosis* Komplex, d.h. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* und *M. canetti*., er ermöglicht jedoch keine Differenzierung innerhalb dieser Spezies. *M. celatum* und *M. terrae*-ähnliche Mykobakterien können in Konzentrationen von mehr als 30 KBE pro Test zu Kreuzreaktionen führen. *M. celatum* und *M. terrae*-ähnliche Mykobakterien werden jedoch selten aus klinischen Proben isoliert.

Die Testergebnisse werden durch Probenentnahme und Transport, Variabilitäten bei der Probenabnahme, technische Fehler des Labors, Fehler bei der Probenidentifikation und durch Fehler bei der Übermittlung der Ergebnisse beeinflusst. Ein negatives Ergebnis schließt nicht aus, daß die Probe Keime des *M. tuberculosis* Komplex enthält.

NORMALWERTE

A. Kontrollwertebereich in klinischen Studien

Folgender Wertebereich für die Kontrollen (RLU) wurde in klinischen Studien von 7 Laboratorien ermittelt:

RLU (N=704)		
	Intervall	Mittelwert
Positive Amplifizierungskontrolle	556.245 bis >2.000.000	>2.000.000
Negative Amplifizierungskontrolle	904 bis 18.754	3.041

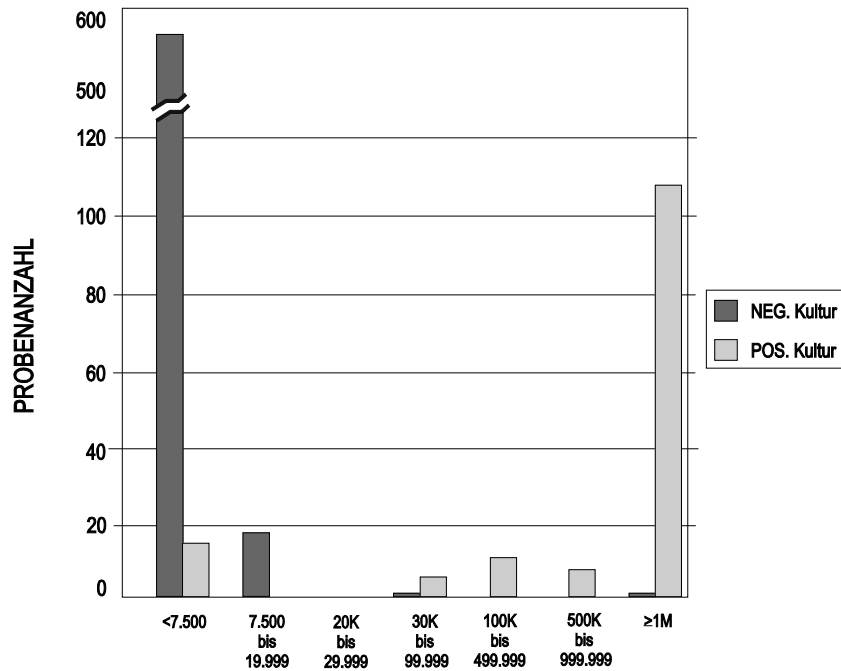
B. Wertebereich der klinischen Proben

Die RLU-Werte von 127 MTD-positiven Proben lagen zwischen 35.777 und > 2.000.000 RLU.

Die RLU-Werte von 577 MTD-negativen Proben lagen zwischen 573 und 19.176 RLU.

Folgende Tabelle gibt Aufschluß über die Häufigkeitsverteilung der RLU-Werte für alle untersuchten Proben nach der Diskrepanzanalyse: Die Diskrepanzanalyse orientiert sich am Vorhandensein anderer kulturpositiver Proben desselben Patienten bzw. an der abschließenden Diagnose des Kliniklers.

**Werteverteilung bei unbehandelten Proben (7 Labors)
N=704**



Kulturergebnisse		<7.500	7.500 bis 19.999	20K bis 29.999	30K bis 99.999	100K bis 499.999	500K bis 999.999	≥1M
<i>M. tuberculosis</i> NEG	554	19	0	1	0	0	0	1
<i>M. tuberculosis</i> POS	13	0	0	4	7	6	108	

PERFORMANCE

A. Klinische Evaluierung

Die ursprüngliche MTD-Test Version wurde in 6 Studien evaluiert und mit mikroskopischen und kulturellen Ergebnissen von 6.079 Proben von 2.609 Patienten verglichen. Von diesen stammten 4.000 Proben von 1.898 Patienten, die keiner Tuberkulosetherapie unterworfen waren. Die 6 Studien wurden an geographisch verschiedenen Orten durchgeführt: Bei 5 dieser Orte handelte es sich um große Krankenhauszentren in amerikanischen Städten mit angeschlossenen Tuberkulosebehandlungszentren, bei einem handelte es sich um ein staatliches Labor des öffentlichen Gesundheitswesens.

Die Performance des aktuellen MTD-Tests wurde in einer ergänzenden Studie in 7 Laboratorien mit mykobakteriellen Kulturresultaten verglichen. Die 7 Studienorte lagen in geographisch unterschiedlichen Regionen. 6 Labors waren in großen städtischen Krankenhauszentren mit Tuberkulosebehandlungszentren, eines dieser 6 Zentren war zusätzlich nationales Referenzzentrum für Tuberkulosedagnostik. Der 7. Studienort war ein Labor des öffentlichen Gesundheitswesens. Es wurden ausschließlich Proben von Patienten ohne Therapie untersucht. Von diesen waren 132 kulturpositiv für den *M. tuberculosis* Komplex. Der MTD konnte 119 dieser kulturpositiven Proben nachweisen. Aus 7 Proben konnten neben *M. tuberculosis* nicht tuberkulöse Mykobakterien nachgewiesen werden.

**Proben Von
UNBEHANDELTEN PATIENTEN
Vergleich MTD / Kultur (N=704)**

FÜR DIE PATIENTEN (vor Diskrepanzanalyse)		
Kultur	+	-
MTD +	54	4
MTD -	4	221

FÜR DIE PATIENTEN (nach Diskrepanzanalyse)		
Kultur	+	-
MTD +	56	2
MTD -	4	221

FÜR DIE PROBEN (vor Diskrepanzanalyse)		
Kultur	+	-
MTD +	119	8
MTD -	13	564

FÜR DIE PROBEN (nach Diskrepanzanalyse)		
Kultur	+	-
MTD +	125	2
MTD -	13	564

Diese Studie enthält Proben von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine aktive Lungentuberkulose vorlag und die nicht therapeutisch behandelt wurden. Die gesamte Prävalenz der Patienten mit positiver Kultur für *M. tuberculosis* betrug 20,5%.

Die mittlere Sensitivität des MTD-Tests betrug bei jedem Patienten im Vergleich zur Kultur 93,3%, die mittlere Spezifität 99,1%. Für die Proben wurde eine mittlere Sensitivität von

90,6% und eine mittlere Spezifität von 99,6% im Vergleich zur Kultur ermittelt. In der folgenden Tabelle sind die Sensitivität, die Spezifität, der positive Vorhersagewert (PVW) sowie der negative Vorhersagewert (NVW) mit den Vertrauensbereichen von 95% für die Performance-Beurteilung aufgeführt. Es handelt sich dabei jeweils um Daten nach Diskrepanzanalyse. Die Diskrepanzanalyse orientiert sich am Vorhandensein anderer kulturpositiver Proben desselben Patienten bzw. an der abschließenden Diagnose des Kliniklers.

Für die Patienten:

	Mittlerer Proozentsatz	Anzahl / Gesamt	95% Konfidenzintervall
Sensitivität	93,3%	56/60	83,8 – 98,2%
Spezifität	99,1%	221/223	96,8 – 99,9%
PVW	96,6%	56/58	88,1 – 99,6%
NVW	98,2%	221/225	95,5 – 99,5%

Für die Proben:

	Mittlerer Proozentsatz	Anzahl / Gesamt	95% Konfidenzintervall
Sensitivität	90,6%	125/138	84,4 – 94,9%
Spezifität	99,6%	564/566	98,7 – 100%
PVW	98,4%	125/127	94,4 – 99,8%
NVW	97,7%	564/577	96,2 – 98,8%

Von den 564 Proben, die in der Kultur und im MTD negativ für *M. tuberculosis* Komplex waren, enthielten 114 Proben atypische Mykobakterien, die in der Kultur nachgewiesen wurden. 64 stammten von Patienten, bei denen in anderen Proben atypische Mykobakterien in der Kultur isoliert werden konnten. 169 stammten von Patienten, bei denen keine Mykobakterien in der Kultur isoliert wurden.

B. Präzision

Präzisionspanels, bestehend aus 2 negativen Proben, 2 schwach positiven Proben (ca. 100 KBE/Test) und 2 mittelmäßig positiven Proben (ca. 1000 KBE/Test) wurden in 3 Laboratorien getestet. Die positiven Proben wurden mittels eines artifiziellen, schwach hemmenden Sedimentpools durch Zugabe einer definierten Menge an *M. tuberculosis* hergestellt. Die Proben sowie die positiven und negativen Amplifizierungskontrollen wurden in allen 3 Laboratorien über 3 Tage zweimal täglich im Dreifachansatz bestimmt.

Da keine signifikante, ortsabhängige bzw. tagesabhängige Variation in den Ergebnissen festzustellen war, wurden die Resultate aller 3 beteiligten Laboratorien in untenstehender Tabelle zusammengefaßt. Die gemessenen RLU-Werte sind durch die Photomultiplermesseinheit des Luminometers begrenzt. Deshalb wurden Werte über 2.000.000 RLU auf den Grenzwert 2.000.000 RLU herabgesetzt. Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sind nicht angegeben.

	Präzision			
	Anzahl Bestimmungen	% korrekte Ergebnisse	Bereich (RLU)	Mittelwert (RLU)
Proben 1: stark positiv	108	100%	154,103 - >2,000,000	>2,000,000
Proben 2: schwach positiv	108	99,1%	16,324 - >2,000,000*	>2,000,000
Proben 3: negativ	108	100%	2,004 - 5,693	2,689
Positive Kontrolle	54	100%	>2,000,000	>2,000,000
Negativ Kontrolle	54	100%	2,272 - 4,241	2,944

*Eine negative Bestimmung

C. Reproduzierbarkeit

Das Panel für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit bestand aus 25 Proben, wobei zwischen jede Probe eine negative Amplifizierungskontrolle gesetzt wurde, so daß insgesamt 50 Tests durchgeführt wurden. Dieses Panel wurde in 4 verschiedenen Laboratorien getestet. Insgesamt entsprachen 100 % (120/120) der negativen Proben und 98,8 % (79/80) der positiven Proben den erwarteten Ergebnissen.

D. Analytische Spezifität

Die Spezifität des MTD-Tests wurde mit Bakterien, Pilzen und Viren überprüft. Für die Spezifitätstestung mittels Bakterien und Pilzen wurden 160 Stämme (151 Arten aus 62 Gattungen) von nah verwandten Mykobakterien, anderen Erregern von Erkrankungen des Respirationstraktes und der normalen Respirationflora, sowie von phylogenetisch repräsentativen Organismen verwendet. Typstämme wurden von der ATCC bezogen. 5 Isolate stammten von klinischen Laboratorien. Lysate aus aktiv wachsenden Kulturen (bzw. in 3 Fällen: rRNA) wurden gemäß der Arbeitsanleitung mit dem MTD-Test evaluiert. Annähernd 5×10^7 KBE pro Reaktion wurden eingesetzt. Nur Stämme des *M. tuberculosis* Komplex lieferten positive Resultate, mit Ausnahme der *M. celatum* und *M. terrae*-ähnliche Stämme. Bei Konzentrationen über 30 KBE pro Test kommt es bei *M. celatum* und einigen *M. terrae*-ähnlichen Stämmen zu positiven Ergebnissen (26.772 RLU für *M. celatum* und 19.470 bis 49.976 RLU für *M. terrae*-ähnliche Mykobakterien).

E. Nachweisgrenze

30 *M. tuberculosis* Stämme aus geographisch sehr unterschiedlichen Gebieten, darunter sowohl resistente als auch sensitive Stämme, wurden mit dem MTD-Test nachgewiesen. Die Nachweisgrenze lag für alle 30 untersuchten Stämme bei 1 KBE/Test.

F. Wiederfindung

25 fg rRNA von *Mycobacterium tuberculosis* (entspricht 5 KBE pro Test) wurden in Gegenwart von annähernd 540.000 KBE pro Test (450 µl) relevanter, Organismen, die nicht zu den Zielspezies gehörten, getestet: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *Nocardia asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *Gordona sputi* und *Rhodococcus bronchialis*. Alle Testergebnisse waren in Gegenwart dieser nicht spezifischen

Organismen, die nicht zu den Zielspezies gehörten positiv für *M. tuberculosis* rRNA und zeigten somit keine Interferenzen.

FEHLERSUCHE-UND BESEITIGUNG

FEHLER	MÖGLICHE URSACHE	EMPFEHLUNGEN
Erhöhte Amplifizierungs-Negativkontrolle oder Negativkontrolle Probenbehandlung (≥ 20.000 RLU)	Ungenügendes Mischen nach Zugabe des Selektionsreagenzes (S) oder zu geringes Volumen des Selektionsreagenzes.	Mischvorgang korrekt wiederholen. Die angegebenen Volumina beachten. Nach dem Vortexen muß eine einheitliche rosa Färbung sichtbar werden.
	Mangelnde Sorgfalt bei der Abarbeitung der Reaktionen und bei der Vermeidung von Kontaminationen.	Das Pipettieren muß mit größter Sorgfalt ausgeübt werden. Die verwendeten Röhren müssen mit einer 1:10 verdünnten Bleichlösung dekontaminiert werden, siehe Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“. Die Arbeitsflächen, Heizblöcke, Wasserbäder und Pipetten müssen wie im Abschnitt „TESTDURCHFÜHRUNG“ beschrieben mit einer 1:2 verdünnten Bleichlösung dekontaminiert werden.
	5-minütige Abkühlungszeit nicht eingehalten.	
	Kontamination von Laboroberflächen oder Reagenzien.	
	Die Röhren wurden vor der Messung nicht abgewischt.	Die Röhren müssen vor der Messung im Luminometer mit einem feuchten Tuch oder holzfreiem Papier abgewischt werden.
Erniedrigte Amplifizierungs-Positivkontrolle oder Positivkontrolle Probenbehandlung (< 500.000 RLU)	Die Amplifizierungsreaktion wurde nicht im geforderten Temperaturbereich durchgeführt.	Wasserbad und/oder Heizblock- Temperatur überprüfen und einstellen.
	Das Amplifizierungsreagenz wurde an die Röhrenwand und nicht auf den Boden pipettiert	Das Reagenz auf dem Vortex sorgfältig mischen (siehe Abschnitt Hybridisierung, Punkt 2). Das Reagenz sollte nach dem Mischen eine homogene Gelbfärbung zeigen.
	Ungenügendes Mischen nach Zugabe des aufgelösten Hybridisierungsreagenzes.	Einstellung der Pipettenvolumina überprüfen.
	Es wurde zuviel Selektionsreagenz zugegeben.	Die 15-minütige Inkubationszeit bei 60°C bei der Selektion einhalten.
	Die Inkubationszeit des Selektionsschrittes war zu lang.	Die Reaktionsröhren müssen direkt und ohne Verzögerung vom 95°C Heizblock in den 42°C Heizblock bzw. das Wasserbad überführt werden.
	Abkühlung der Amplifizierungsröhren auf 42°C nach der Inkubation bei 95°C.	
	Die Pumpenschläuche der Detektionsreagenzien am Gerät sind verstopft.	Das Pumpensystem mit heißem Wasser durchspülen (siehe Handbuch).

HINWEISE

- A. Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme zu verwenden.
- B. Zur Lagerung der tiefgefrorenen Aliquots empfiehlt es sich, Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluß zu verwenden. Tiefgefrorene Aliquots dürfen nur einmal aufgetaut werden. Verwenden Sie kein Tiefkühlgerät mit automatischer Abtauvorrichtung.
- C. Zur Lagerung der tiefgefrorenen Aliquots empfiehlt es sich, Kryoröhrchen für 5 ml zu verwenden. Tiefgefrorene Aliquots dürfen nur einmal aufgetaut werden. Verwenden Sie kein Tiefkühlgerät mit automatischer Abtauvorrichtung.
- D. Wegen der unterschiedlichen Ausführung der einzelnen Vortex-Geräte müssen die Mischzeiten gegebenenfalls angepaßt werden. Stellen Sie die Geschwindigkeit des Gerätes gemäß den Hinweisen im § „TESTDURCHFÜHRUNG Abschnitt E“ so ein, daß das Reaktionsgemisch die obere Hälfte der Röhrchen erreicht. Um präzise Ergebnisse zu erhalten, ist eine einwandfreie Homogenisierung unbedingt erforderlich. Die Mischzeiten können bis zu 15 sec verlängert werden, ohne daß die Ergebnisse dadurch beeinflußt werden.

BIBLIOGRAPHIE

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 (Hologic) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples." Esm 2002.



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



Kundensupport: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Technischer Kundendienst: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Weitere Kontaktinformationen finden Sie unter www.hologic.com.

Hologic, Amplified MTD, und Leader sind Marken und/oder eingetragene Marken von Hologic, Inc. und/oder seinen Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, gehören dem jeweiligen Eigentümer.

Dieses Produkt ist ggf. von mindestens einem US-Patent geschützt (siehe www.hologic.com/patents).



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

AW-12601-801 Rev. 003 (DE)
©1995 - 2018 Hologic, Inc. Alle Rechte vorbehalten.
2018-03