

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860)**

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΟ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ
(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι μια ταχεία εξέταση με ανιχνευτή DNA (DNA probe) η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊνικού οξέως για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium tuberculosis* (TB Complex) που απομονώνεται από καλλιέργεια. Το TB Complex αποτελείται από τα ακόλουθα είδη: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, και *M. canetti* (8, 11).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Οι οργανισμοί του TB Complex είναι υπεύθυνοι για σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ανθρώπους. Το *M. tuberculosis* είναι το πιο συχνό παθογόνο του TB Complex που απομονώνεται από ανθρώπους. 21.244 νέες περιπτώσεις φυματίωσης αναφέρθηκαν το 1988 (2). Το *M. bovis BCG* μπορεί να μεταδοθεί από μολυσμένα ζώα σε ανθρώπους (6). Το *M. africanum* προκαλεί πνευμονική φυματίωση στην τροπική Αφρική (9) και το *M. microti* μολύνει κυρίως ζώα.

Η φυματίωση είναι ιδιαίτερα μεταδοτική, ως εκ τούτου η ταχεία διάγνωση της νόσου είναι σημαντική. Για τα περισσότερα κλινικά εργαστήρια, η ταξινόμηση ενός απομονωμένου στελέχους στο TB Complex αρκεί επειδή η πιθανότητα να ανήκει ένα απομονωμένο στέλεχος σε ένα είδος διαφορετικό από το *M. Tuberculosis* είναι πολύ μικρή (5,6,10). Συνιστάται μια σειρά βιοχημικών εξετάσεων για να καθοριστούν τα είδη των μελών του TB Complex εφόσον απαιτείται επιπλέον διαφοροποίηση.

Οι κλασικές μέθοδοι ταυτοποίησης μυκοβακτηρίων στηρίζονται στη χρώση δειγμάτων για οξεάντοχους βάκιλλους και κατόπιν στην καλλιέργεια και τη βιοχημική εξέταση. Μπορεί να χρειαστεί μέχρι και δυο μήνες για να κατηγοριοποιηθεί σε είδος ένα απομονωμένο στέλεχος χρησιμοποιώντας αυτές τις τυπικές τεχνικές. (3).

Η εξέταση AccuProbe ταυτοποίησης MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ταυτοποιεί το TB Complex που απομονώνεται από καλλιέργεια σε λιγότερο από μία ώρα.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Οι εξετάσεις υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων βασίζονται στην ικανότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων των νουκλεϊνικών οξέων να παρατάσσονται η μια απέναντι στην άλλη και να συνδέονται μεταξύ τους ειδικά σχηματίζοντας σταθερά δίκλινα σύμπλοκα (4). Το σύστημα AccuProbe χρησιμοποιεί ένα μονόκλωνο ανιχνευτή DNA με σήμανση χημειοφωταύγειας ο οποίος είναι συμπληρωματικός στο ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου. Αφότου απελευθερωθεί το ριβοσωμικό RNA από τον οργανισμό, ο σημασμένος ανιχνευτής DNA ενώνεται με το ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου για να σχηματίσει ένα σταθερό υβρίδιο DNA RNA. Το Αντιδραστήριο Επιλογής επιτρέπει τη διαφοροποίηση του μη υβριδοποιημένου από τον υβριδοποιημένο ανιχνευτή. Τα σημασμένα υβρίδια DNA RNA μετρώνται στον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic. Ένα θετικό αποτέλεσμα είναι μια ανάγνωση στον αναλυτή χημειοφωταύγειας ίση ή μεγαλύτερη από το cut off. Μια τιμή μικρότερη από αυτό το cut off είναι ένα αρνητικό αποτέλεσμα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

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

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX PROBE KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX)

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

Σωληνάρια Λύσης (Lysing Tubes) (LT)
Γυάλινα σφαιρίδια και ρυθμιστικό διάλυμα.

(1 x 20 Σωληνάρια)

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

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

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

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

**HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ HOLOGIC ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)**

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

Αντιδραστήριο Ανίχνευσης II (Detection Reagent)(RII) 1 x 240 mL
1 N υδροξειδίο του νατρίου.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

A. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

B. Χρησιμοποιείτε τις παγκόσμιες προφυλάξεις ασφαλείας όταν εκτελείτε αυτή την εξέταση (1).

Γ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά για την ταυτοποίηση του TB Complex που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

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

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

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

Ζ. Αποφεύγετε την επαφή των Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) I και II με το δέρμα, τα μάτια, και το βλεννογόνο. **ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: ΔΙΑΒΡΩΤΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ** Εάν προκύψει επαφή με αυτά τα αντιδραστήρια ξεπλύνετε με νερό. Εάν συμβεί απόχυση αυτών των αντιδραστηρίων, αραιώστε με νερό πριν σκουπίσετε.

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΦΥΛΑΞΗΣ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ

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

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

ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση του TB Complex που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

A. Μέθοδος Στερεών Υλικών. Μπορεί να εξεταστεί η ανάπτυξη από κατάλληλα στερεά υλικά, όπως Lowenstein-Jensen υπό κλήση ή τρυβλία Middelbrook 7H10 ή 7H11, TB Complex, με πιθανή ύπαρξη TB Complex. Τα δείγματα μπορούν να εξεταστούν μόλις είναι ορατή η ανάπτυξη με γυμνό οφθαλμό και κατά τη διάρκεια των επόμενων εξήντα ημερών επώασης.

1. Η ανάπτυξη μπορεί να αφαιρεθεί με ένα 1 μl πλαστικό κρίκο μιας χρήσης, συρμάτινο κρίκο, ή πλαστική βελόνα μιας χρήσης. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στυλεοί λόγω της μικρής ποσότητας υγρού στο οποίο κατόπιν επαναιωρούνται τα κύτταρα.
2. Αποφεύγετε να λαμβάνετε μέρος του στερεού υλικού μαζί με τα κύτταρα.
3. Ο χειριστής μπορεί να επιλέξει να ενοφθαλμίσει ένα άλλο τρυβλίο καλλιέργειας σε αυτή τη χρονική στιγμή για να επιβεβαιώσει την καθαρότητα του απομονωμένου στελεχούς.

B. Μέθοδος Καλλιέργειας Ζωμού. Με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορεί να εξεταστεί ανάπτυξη σε ζωμό Middlebrook 7H9 με θολερότητα ισοδύναμη ή μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την πρότυπη θολοσιμετρική κλίμακα McFarland 1. Εισάγετε ένα δείγμα 100 μL από το καλά αναμεμιγμένο εναιώρημα ζωμού στα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

(bioMérieux ref. 39000 / Hologic Cat. No. 102860)

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

20 Εξετάσεις

4 x 5 σωληνάρια
1 x 20 σωληνάρια

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΜΗ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

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

Έλεγχος στελεχών καλλιέργειας

Υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα * (59,5° έως 61°C)

Υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα* (95° ± 5 °C)

Μικροδιανεμητές (Micropipettes) (100 μL, 300 μL)

Σύστημα επαναληπτικής αναρρόφησης (Re-pipettor) (100 μL, 300 μL)

Αναδευτήρας τύπου Vortex

Πρότυπο Θολοσίμετρο McFarland 1

*Οι θερμαντικές πλάκες θα πρέπει να διαθέτουν οπές κατάλληλου μεγέθους για σωληνάρια 12 x 75 mm.

Συνιστάται η χρήση θερμαντικής πλάκας Hologic.

ΔΙΑΤΙΘΕΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΟΠΙΚΟ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟ ΤΗΣ HOLOGIC

Hologic Leader 50i Luminometer (Αναλυτής χημειοφωταύγειας)

(bioMérieux ref. 39400 / Hologic Cat. No. 103100i)

Hologic Sonicator (Συσκευή Υπερήχων)

(bioMérieux ref. 39409 / Hologic Cat. No. 901104)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)

(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ HOLOGIC) (1200 εξετάσεις)

(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

Θερμαντική πλάκα (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406)

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

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

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

A. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

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

α. Προσθέστε αρκετό νερό για να γεμίσετε τη συσκευή υπερήχων μέχρι 1/2 ίντσα από το επάνω μέρος της δεξαμενής νερού.

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

2. Ρυθμίστε μια θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 59,5° έως 61°C και μια άλλη θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 95° ± 5°C.

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

B. ΕΛΕΓΧΟΙ

Θετικά και αρνητικά στελέχη ελέγχου θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά σε κάθε εργαστήριο σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς. Μία καλλιέργεια *Mycobacterium tuberculosis* (π.χ. American Type Culture Collection, ATCC #25177) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός έλεγχος ενώ η καλλιέργεια *Mycobacterium avium* (π.χ. ATCC #25291) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός έλεγχος.

Γ. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.

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

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

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

Δ. ΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

2. Υποβάλλετε σε κατεργασία υπερήχων για 15 λεπτά.

3. Τοποθετήστε τα Σωληνάρια Αντιδραστηρίου Λύσης που περιέχουν τους οργανισμούς που υποβλήθηκαν σε κατεργασία υπερήχων με μια θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους 95° ± 5°C.

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

E. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

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

2. Επιστημάνετε επαρκή αριθμό Σωληναρίων με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη της καλλιέργειας ή/ και τους ελέγχους. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.

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

4. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια Αντιδραστηρίου Ανιχνευτή και επωάστε για 15 λεπτά στους 60° + 1° C (7) σε υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα.

ΣΤ. ΕΠΙΛΟΓΗ

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

2. Επωάστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για 5 λεπτά στους 60° + 1° C σε υδατόλουτρο ή θερμαντική πλάκα.

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

Ζ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

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

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

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ

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

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

Γ. ΧΡΟΝΟΣ: Οι αντιδράσεις Υβριδισμού και Επιλογής εξαρτώνται από το χρόνο. Υποβάλλετε σε υβριδισμό για 15 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά. Επωάστε τα Σωληνάρια με το Αντιδραστήριο Ανιχνευτή κατά το βήμα ΕΠΙΛΟΓΗΣ για 10 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι για περισσότερο από 11 λεπτά.

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

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

ΣΤ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

1. Αυξημένες τιμές αρνητικού ελέγχου (*Mycobacterium avium* ATCC #25291) άνω των 10,000 RLU (Σχετικές Μονάδες Φωτός) στο LEADER ή 300 PLU (Φωτομετρικές Μονάδες Φωτός) στο AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή ανάμειξη μετά την

προσθήκη του Αντιδραστηρίου 3 (Αντιδραστήριο Επιλογής) ή από την εξέταση ανάμεικτων καλλιέργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιέργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωασθεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

2. Οι μειωμένες θετικές τιμές ελέγχου (*M. tuberculosis* ATCC #25177) κάτω των 30,000 RLU στο Leader ή 900 PLU στο AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή αριθμό κυττάρων, ανεπαρκή κατεργασία με υπερήχους, ή εξέταση ανάμικτων ή παλαιών καλλιέργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιέργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωασθεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

	AccuLDR (πρώην PAL)	Leader
Τιμή cut-off	900 PLU	30.000 RLU
Εύρος επανάληψης	600 - 899 PLU	20,000-29,999 RLU

Γ. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αρνητικός ορός ελέγχου (π.χ. *M. avium* ATCC #25291) και ο θετικός έλεγχος (π.χ., *M. tuberculosis*, ATCC #25177) θα πρέπει να ικανοποιούν τις ακόλουθες τιμές:

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

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

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

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ δεν κάνει διάκριση μεταξύ των διαφόρων μελών του TB Complex, π.χ., *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, και *M. canetti*. Το Αντιδραστήριο Ανιχνευτή δεν αντιδρά με κανένα μυκοβακτηρίδιο εκτός από το βακτηρίδιο της φυματίωσης (MOTT).

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

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με τυπικές μεθόδους βιοχημικής ταυτοποίησης καλλιέργειας σε δύο τύπους χρησιμοποιώντας συνολικά 612 απομονωμένα στελέχη του TB Complex, 748 απομονωμένα στελέχη 28 άλλων ειδών *Mycobacterium*, και 7 άλλα μικροβιακά απομονωμένα στελέχη που αντιπροσωπεύουν 1 γένος. Η τυπική ταυτοποίηση από καλλιέργεια εξαρτάται από το ρυθμό ανάπτυξης, τη μορφολογία των αποικιών, τη μικροσκοπική εξέταση και μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων. Τα απομονωμένα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως θετικά (> 30,000 RLU) ή αρνητικά (< 30,000 RLU). Το εύρος των παρατηρήσεων για αρνητικές καλλιέργειες ήταν 226 έως 33,343 RLU

και 4,163 έως 646,053 RLU για θετικές καλλιέργειες. Μια σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τις τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια παρουσιάζεται παρακάτω.

ACCUPROBE / ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

AccuProbe Καλλιέργεια	Θετ. Θετ.	Θετ. Αρν.	Αρν. Θετ.	Αρν. Αρν.	Ευαισθησία/ Ειδικότητα	Ποσοστό Συμφωνίας
ΤΟΠΟΣ 1	422	1	1	541	99,8%/99,1%	99,8%
ΤΟΠΟΣ 2	185	0	4	213	98,9%/100%	99,0%
Σύνολο	607	1	5	754	99,2%/99,9%	99,6%

Όταν επανεξετάστηκαν τα ασύμφωνα δείγματα, προέκυψαν σωστά αποτελέσματα με εξαίρεση ενός απομονωμένου στελεχούς από τον Τόπο 2 που ήταν μη βιώσιμο.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

A. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η ακρίβεια εντός της σειράς της ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ υπολογίστηκε αναλύοντας δύο συγκεντρώσεις ριβοσωμικού RNA που απομονώθηκε από *Mycobacterium tuberculosis* χρησιμοποιώντας 10 αντίγραφα σε μια μόνο ανάλυση.

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	10	10
Μέση Απόκριση	51,939	126,563
Τυπική Απόκλιση	1,980	5,869
Συντελεστής Διακύμανσης	3,8%	4,6%

B. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

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

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	12	12
Μέση Απόκριση	51,522	126,227
Τυπική Απόκλιση	1,952	4,575
Συντελεστής Διακύμανσης	3,8%	3,6%

Γ. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αξιολογήθηκαν συνολικά 94 ATCC απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσώπευαν ένα σύνολο 92 ειδών από 40 γένη. Έξι απομονωμένα στελέχη του of TB Complex (*M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* and *M. tuberculosis*), 25 απομονωμένα στελέχη 25 άλλων ειδών *Mycobacterium* και 63 απομονωμένα στελέχη από 39 άλλα γένη που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικό φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Όλα τα απομονωμένα στελέχη του TB Complex που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη έδωσαν ένα θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Άλλα είδη *Mycobacterium* και τα αντιπροσωπευτικά φυλογενετικά διασταυρούμενα είδη δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας αυτή την εξέταση.

Δ. ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Το ριβοσωμικό RNA του *Mycobacterium tuberculosis* σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5×10^{-4} μg έως 1×10^{-1} μg ανά εξέταση αναλύθηκε παρουσία 30 εκατομμυρίων κυττάρων είτε: *M. avium*, *M. kansasii*, ή *Nocardia asteroides*. Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή του σήματος για *M.*

Tuberculosis και οι άλλοι οργανισμοί που ήταν παρόντες δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.



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



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

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

102896F-01-EL Rev. 003 2018-03
©1990 - 2018 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.