

**STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)**

ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΟ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ
(bioMérieux ref. 39204 / Hologic Cat. No. 102865)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι μια ταχεία εξέταση με ανιχνευτή DNA (DNA probe) η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊνικού οξέως για την ταυτοποίηση του *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) που απομονώνεται από καλλιέργεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ο *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) είναι το κύριο αίτιο της κοινής επίκτητης βακτηριακής πνευμονίας στις Ηνωμένες Πολιτείες, που προκύπτει σε μισό εκατομμύριο περιστατικών περίπου ετησίως, με ποσοστό επιπλοκών και θανάτων που φθάνει το 5% περίπου (2, 4). Επίσης είναι το κύριο αίτιο μέσης ωτίτιδας και βακτηριαιμίας σε βρέφη και παιδιά (2). Ο *S. pneumoniae* είναι το συνηθέστερο αίτιο μηνιγγίτιδας και έχει απομονωθεί από ασθενείς με επιπεφυκίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα, μαστοειδίτιδα, περικαρδίτιδα, λανθάνουσα βακτηριαιμία, αρθρίτιδα και ενδοκαρδίτιδα (2). Είναι το τρίτο πιο συχνά απομονωμένο στέλεχος από καλλιέργεια αίματος (6). Ο *S. pneumoniae* μπορεί να θεωρείται μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας της άνω αναπνευστικής οδού, ωστόσο, βρέφη, ηλικιωμένοι και εξασθενημένοι ασθενείς με άλλες ιατρικές παθήσεις που θέτουν σε κίνδυνο την αναπνευστική οδό, ή με μειωμένη ανοσολογική λειτουργία, διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν πνευμονοκοκκική νόσο (2, 3, 4).

Η υποθετική ταυτοποίηση γίνεται με παραδοσιακές φυσιολογικές και βιοχημικές μεθόδους. Αυτές περιλαμβάνουν μορφολογία αποικιών, χρώση Gram, δοκιμασία καταλάσης, αιμολυτική δραστηριότητα σε 5% άγαρ αίματος προβάτου, ευαισθησία optochin, και bile solubility (2). Περισσότεροι από 80 ορρότυποι έχουν ταυτοποιηθεί, με βάσει τους πολυσακχαρίτες του καψιδίου. Η εξέταση Quellung, που βασίζεται στην εμφανή διόγκωση του καψιδίου σαν αντίδραση στη θεραπεία με αντι-ορούς για αυτούς τους πολυσακχαρίτες, είναι άλλος ένας τρόπος ταυτοποίησης. Όλες οι εξετάσεις που αναφέρονται παραπάνω είναι υποκειμενικές, και καμία δεν παρέχει από μόνη της αναμφίβολη ταυτοποίηση του *S. pneumoniae*.

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ προσφέρει μια ταχεία, μη υποκειμενική μέθοδο για την οριστική ταυτοποίηση του *S. pneumoniae* που βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του ριβοσωμικού RNA που είναι μοναδικές στον *S. pneumoniae*.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Οι εξετάσεις υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων βασίζονται στην ικανότητα των συμπληρωματικών αλυσίδων νουκλεϊνικών οξέων να παρατάσσονται η μία απέναντι στην άλλη και να συνδέονται μεταξύ τους ειδικά σχηματίζοντας σταθερά δίκλινα σύμπλοκα (5). Το σύστημα AccuProbe χρησιμοποιεί ένα μονόκλωνο ανιχνευτή DNA με σήμανση χημειοφωταύγειας ο οποίος είναι συμπληρωματικός στο ριβοσωμικό RNA του οργανισμού στόχου. Αφού 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 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ διατίθενται σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες:

**ACCUPROBE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE PROBE KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE)**

Αντιδραστήριο Ανιχνευτή (Probe Reagent) (P) (10 x 2 σωληνάκια)
Streptococcus pneumoniae.

**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) (2) 1 x 10 mL
(Hybridization Buffer)
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% υπεροξειδίου υδρογόνου σε 0,001 N νιτρικό οξύ.

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

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- A. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- B. Χρησιμοποιείτε τις παγκόσμιες προφυλάξεις ασφαλείας όταν εκτελείτε αυτή την ανάλυση (1).
- Γ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά για την ταυτοποίηση *Streptococcus pneumoniae* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.
- Δ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά τα παρεχόμενα ή ειδικά αναλώσιμα εργαστηριακά είδη.
- E. 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.
- ΣΤ. Αποφεύγετε την επαφή των Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) I και II με το δέρμα, τα μάτια, και το βλεννογόνο. Εάν προκύψει επαφή του δέρματος 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 στους σφραγισμένους φακέλους 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 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορούν να φυλάσσονται μεταξύ 2° και 25°C και είναι σταθερά μέχρι την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.**ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι σχεδιασμένη για τον προσδιορισμό του *S. pneumoniae* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

A. Μέθοδος Στερεών Υλικών. Μπορεί να εξεταστεί η ανάπτυξη από κατάλληλα στερεά υλικά, όπως Άγαρ Αίματος Προβάτου 5% με μορφολογία με πιθανή ύπαρξη *S. pneumoniae*. Τα δείγματα μπορούν να εξεταστούν μόλις είναι ορατή η ανάπτυξη αλλά θα πρέπει να είναι πιο πρόσφατες από 48 ώρες.

1. Οι ευδιάκριτες αποικίες μπορούν να αφαιρεθούν από το στερεό υλικό με ένα 1 mL πλαστικό κρίκο μιας χρήσης, συρμάτινο κρίκο, πλαστική βελόνα μιας χρήσης, ή με ράβδο εφαρμογής. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στυλεοί λόγω της μικρής ποσότητας υγρού στο οποίο κατόπιν επαναιωρούνται τα κύτταρα.
2. Εάν πρόκειται να εξεταστεί μια αποικία, θα πρέπει να έχει διάμετρο τουλάχιστον 1 mm. Εναλλακτικά, μπορούν να εξεταστούν αρκετές (3 έως 4) μικρότερες αποικίες. ΜΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΕ ΠΛΗΡΕΣ ΤΑΠΗΤΙΟ.
3. Αποφεύγετε να λαμβάνετε μέρος του στερεού υλικού μαζί με τα κύτταρα.
4. Ο χειριστής μπορεί να επιλέξει να ενοφθαλμίσει ένα άλλο τρυβλίο καλλιέργειας σε αυτή τη χρονική στιγμή για να επιβεβαιώσει την καθαρότητα του απομονωμένου στελέχους.

B. Μέθοδος Καλλιέργειας Ζυμού. Μπορούν να εξεταστούν κατάλληλες καλλιέργειες ζυμού, όπως Trypticase Soy ή Brain Heart Infusion με θολερότητα ισοδύναμη ή μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την Πρότυπη Θολοσιμετρική κλίμακα McFarland 1. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες ζυμού, που έχουν επωαστεί μέχρι 24 ώρες στους 37°C. Εισάγετε ένα δείγμα 50 mL από το καλά αναμειγμένο εναιώρημα ζυμού στο Σωληνάριο με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή, όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
bioMérieux ref. 39204 / Hologic Cat. No. 102865

Αντιδραστήριο Ανιχνευτή (Probe Reagent) (P)

20 Εξετάσεις
10 x 2 σωληνάρια

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΜΗ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

1 mL στείροι πλαστικοί κρίκοι ενοφθαλμισμού, συρμάτινοι κρίκοι, πλαστικές βελόνες ή ράβδοι εφαρμογής για επιλογή αποικιών
Έλεγχος στελεχών καλλιέργειας
Υδατόλουτρο ή Θερμαντική πλάκα* (60° ± 1°C)
Μικροδιανεμητές (Micropipettes) (50 µL, 300 µL)

Σύστημα επαναληπτικής αναρρόφησης (Re-pipettor) (50 µL, 300 µL)
Αναδευτήρας τύπου Vortex

*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 HOLOGIC

Hologic Leader 50i Luminometer (Αναλυτής χημειοφωταύγειας)
(bioMérieux ref. 39400 / Hologic Cat. No. 103100i)

Θερμαντική πλάκα (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ HOLOGIC ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)
(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

A. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

1. Ρυθμίστε το υδατόλουτρο ή τη θερμαντική πλάκα στους 60° ± 1°C.
2. Ετοιμάστε τον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic για λειτουργία. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης I και II για την ολοκλήρωση των εξετάσεων. Εάν δεν περιέχονται επαρκή αντιδραστήρια στους περιέκτες, γεμίστε σύμφωνα με τις οδηγίες του Εγχειριδίου Χρήσης.

B. ΕΛΕΓΧΟΙ

Θετικά και αρνητικά στελέχη ελέγχου θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά σε κάθε εργαστήριο σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς. Μια καλλιέργεια *Streptococcus pneumoniae* (π.χ., American Type Culture Collection, ATCC #33400) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός έλεγχος ενώ η καλλιέργεια *Streptococcus bovis* (π.χ., ATCC #33317) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός έλεγχος.

Γ. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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 από καλλιέργεια ή/και τους ελέγχους. Ξανασφραγίστε το φάκελο διπλώνοντας το ανοιγμένο άκρο αρκετές φορές και ασφαλίζοντάς το με αυτοκόλλητη ταινία ή κλιπ. **Αφήστε τον αφυγραντή μέσα στον φάκελο.**
2. Επισημάνετε επαρκή αριθμό Σωληναρίων με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια ή/και τους ελέγχους. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.
3. Εισάγετε 50 µL του Αντιδραστηρίου 1 (Αντιδραστήριο Λύσης) σε όλα τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή. **Εάν πρόκειται να εξεταστούν καλλιέργειες ζυμού, μην προσθέτετε Αντιδραστήριο 1 στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή.**
4. Μεταφέρετε μια αποικία 1 mm ή αρκετές μικρότερες αποικίες από το στερεό υλικό ή 50 µL μιας καλά αναμεμιγμένης καλλιέργειας ζυμού στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Περιστρέψτε τον κρίκο, τη βελόνα ή τη ράβδο στο μείγμα Αντιδραστηρίου 1 (Αντιδραστήριο Λύσης) για να αφαιρέσετε τα κύτταρα, εάν εξετάζεται ανάπτυξη σε στερεά υλικά και αναμείξτε καλά.

Δ. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

1. Εισάγετε 50 μL του Αντιδραστήριου 2 (Ρυθμιστικό Διάλυμα Υβριδισμού) σε όλα τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή και αναμείξτε ανακινώντας ή σε vortex.
2. Επώαστε για 15 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο ή θερμομαντική πλάκα.

Ε. ΕΠΙΛΟΓΗ

1. Αφαιρέστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή από το υδατόλουτρο ή τη θερμομαντική πλάκα. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα. Εισάγετε 300 μL του Αντιδραστήριου 3 (Αντιδραστήριο Επιλογής) σε κάθε σωληνάριο. Καλύψτε ξανά τα σωληνάρια και ανακινήστε με Vortex για να αναμειχθούν εντελώς.
2. Επώαστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για 5 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο ή θερμομαντική πλάκα.

3. Αφαιρέστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή από το υδατόλουτρο ή τη θερμομαντική 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 αφαίρεση τους από το υδατόλουτρο ή τη θερμομαντική πλάκα.**

ΣΤ. 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 στους 2° έως 8°C . Η θέρμανση και ανάμειξη του διαλύματος στους 35° έως 60°C διαλύει το ίζημα.

B. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: Είναι σημαντικό να λαμβάνεται δείγμα ανάπτυξης από μια περιοχή του στερεού υλικού όπου υπάρχουν απομονωμένες αποικίες.

Γ. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ: Οι αντιδράσεις Προετοιμασίας Δείγματος, Υβριδισμού και Επιλογής εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Επομένως, είναι απαραίτητο να διατηρείται η συσκευή επώασης, το υδατόλουτρο ή η θερμομαντική πλάκα εντός του οριζόμενου εύρους θερμοκρασίας.

Δ. ΧΡΟΝΟΣ:

1. Η Αντίδραση Υβριδισμού θα πρέπει να αρχίζει εντός 30 λεπτών από την προσθήκη των κυττάρων και του Αντιδραστήριου 1 στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή.
2. Οι αντιδράσεις Υβριδισμού και Επιλογής εξαρτώνται από το χρόνο. Υποβάλλετε σε υβριδισμό για 15 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 20 λεπτά. Επώαστε τα Σωληνάρια με το Αντιδραστήριο Ανιχνευτή κατά το βήμα ΕΠΙΛΟΓΗΣ για 5 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 6 λεπτά.

Ε. ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ: Το επίπεδο του ύδατος στο υδατόλουτρο θα πρέπει να διατηρείται σε τέτοιο ύψος ώστε να διασφαλίζεται ότι βυθίζεται όλη η ποσότητα του υγρού αντίδρασης που βρίσκεται

στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή, αλλά ταυτόχρονα το επίπεδο του ύδατος δεν πρέπει να είναι τόσο υψηλό ώστε να εισέρχεται το ύδωρ μέσα στα σωληνάρια.

ΣΤ. ΑΝΑΚΙΝΗΣΗ ΜΕ VORTEX: Είναι κρίσιμης σημασίας να υπάρχει ομοιογενές μείγμα κατά τη διάρκεια του βήματος ΕΠΙΛΟΓΗΣ, ειδικά μετά την προσθήκη του Αντιδραστηρίου 3.

Z. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ:

1. Οι αυξημένες αρνητικές τιμές ελέγχου (*Streptococcus bovis* ATCC #33317) άνω των 20.000 RLU (Σχετικές Μονάδες Φωτός) στο Leader ή 600 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 ανάμικτων καλλιιεργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιιεργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

2. Οι μειωμένες θετικές τιμές ελέγχου (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) κάτω των 50.000 RLU ή 1.500 PLU στο AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή αριθμό κυττάρων, εξέταση ανάμικτων ή παλαιών καλλιιεργειών, ή εάν αφεθούν τα κύτταρα στο Αντιδραστήριο 1 περισσότερο από 30 λεπτά πριν από την προσθήκη του Αντιδραστηρίου 2. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιιεργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE 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 αυτές τις τιμές cut-off θεωρούνται αρνητικά. Τα αποτελέσματα σε εύρος επανάληψης θα πρέπει να επαναλαμβάνονται.

	AccuLDR (πρώην PAL)	Leader
Τιμή Cut-off	1,500 PLU	50,000 RLU
Εύρος επανάληψης	1,200-1.499 PLU	40,000-49,999 RLU

B. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αρνητικός έλεγχος (π.χ., *Streptococcus bovis*, ATCC #33317) και ο θετικός έλεγχος (π.χ., *Streptococcus pneumoniae*, ATCC #33400) θα πρέπει να ικανοποιούν τις ακόλουθες τιμές:

	AccuLDR (πρώην PAL)	Leader
Αρνητικός έλεγχος	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Θετικός έλεγχος	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος αυτή έχει εξεταστεί χρησιμοποιώντας πρόσφατη ανάπτυξη από στερεά υλικά και καλλιιεργειες ζυμού που αναφέρονται στο Τμήμα ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Η αποτελεσματικότητα αυτής της εξέτασης δεν έχει αποδειχθεί σε απευθείας κλινικά δείγματα.

Τα αποτελέσματα από την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE 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 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με τυπικές βιοχημικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια σε δύο τόπους χρησιμοποιώντας συνολικά 662 κλινικά απομονωμένα στελέχη. Από αυτά, 305 ήταν απομονωμένα στελέχη *S. pneumoniae*, 185 ήταν απομονωμένα στελέχη άλλων ειδών *Streptococcus*, 172 ήταν άλλα μικροβιακά απομονωμένα στελέχη που αντιπροσωπεύουν 25 γένη. Οι τυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης περιλαμβάνουν χρώση Gram, μορφολογία αποικιών, δοκιμασία καταλάσης, αιμολυτική δραστηριότητα σε 5% άγαρ αίματος προβάτου, ευαισθησία orthochin, και bile solubility. Τα απομονωμένα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως θετικά ($\geq 50,000$ RLU) ή αρνητικά ($< 50,000$ RLU). Το εύρος των παρατηρήσεων για αρνητικές καλλιέργειες ήταν 344 έως 32.911 RLU και 59,223 έως 863,193 RLU για θετικές καλλιέργειες. Μια σύγκριση της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ με τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια παρουσιάζονται παρακάτω.

ACCUPROBE / ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

AccuProbe	Θετ.	Θετ.	Αρν.	Αρν.	Ευαισθησία/ Ειδικότητα	Ποσοστό Συμφωνίας
Καλλιέργεια	Θετ.	Αρν.	Θετ.	Αρν.		
Τόπος 1	202	0	0	212	100%/100%	100%
Τόπος 2	103	0	0	145	100%/100%	100%
Σύνολο	305	0	0	357	100%/100%	100%

Όλα τα απομονωμένα στελέχη *S. pneumoniae* έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και όλα τα άλλα κλινικά απομονωμένα στελέχη που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Το ποσοστό ευαισθησίας, ειδικότητας και συμφωνίας της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ σε σύγκριση με τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια είναι 100%.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ**A. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ**

Η ακρίβεια εντός της σειράς της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ υπολογίστηκε αναλύοντας δύο συγκεντρώσεις ριβωσωμικού RNA που απομονώθηκε από *S. pneumoniae* χρησιμοποιώντας 10 αντίγραφα σε μια μόνο ανάλυση.

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	10	10
Μέση Απόκριση	101,292	56,025
Τυπική Απόκλιση	4,293	1,743
Συντελεστής Διακύμανσης	4,2%	3,1%

B. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Η ακρίβεια μεταξύ των σειρών υπολογίστηκε αναλύοντας τις ίδιες δύο συγκεντρώσεις του ριβωσωμικού RNA του *S. pneumoniae* χρησιμοποιώντας απλούς προσδιορισμούς σε 12 συνεχόμενες σειρές.

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	12	12
Μέση Απόκριση	101,322	53,288
Τυπική Απόκλιση	3,660	1,776
Συντελεστής Διακύμανσης	3,6%	3,3%

Γ. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αξιολογήθηκαν συνολικά 95 ATCC απομονωμένα στελέχη αναφοράς χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσώπευαν συνολικά 78 είδη από 51 γένη. Πέντε απομονωμένα στελέχη *S. pneumoniae*, 24 απομονωμένα στελέχη από 13 άλλα είδη *Streptococcus* και 66 απομονωμένα στελέχη από 50 άλλα γένη που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Όλα τα απομονωμένα στελέχη *S. pneumoniae* που εξετάστηκαν έδωσαν θετικά αποτελέσματα χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Άλλα είδη *Streptococcus* και αντιπροσωπευτικά φυλογενετικά διασταυρούμενα είδη δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας αυτή την εξέταση.

Δ. ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Επτά διαδοχικές αραιώσεις κυττάρων του *S. pneumoniae* που κυμαίνονται από 3 χιλιάδες έως 30 εκατομμύρια κύτταρα ανά ανάλυση εξετάστηκαν παρουσία 30 εκατομμυρίων κυττάρων από τα ακόλουθα μη στοχευόμενα είδη: *Streptococcus salivarius* και *Streptococcus bovis*. Η παρουσία αυτών των μη στοχευόμενων ειδών δεν παρεμβλήθηκε με το θετικό σήμα των κυτταρικών αραιώσεων του *S. pneumoniae*, ούτε δημιούργησαν θετική αντίδραση με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
2. **Facklam, R.R., and R.B. Carey.** 1985. Streptococci and aerococci, p.154-175. In E.H. Lennette, *et al* (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. **Finegold, S.M., and E.J. Baron.** 1986. Streptococci, including enterococci and pneumococci, and aerococcus, p.366-387. In Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 7th ed. C.V. Mosby Company, Saint Louis, MO.
4. **Klainer, A.S.** 1983. Pneumococcal pneumoniae, p.3-9. In L. Weinstein, and B.N. Fields (ed.), Seminars in infectious disease V, 1 st ed. Thieme-Statton, Inc. New York, N.Y.
5. **Kohne, D.E., A.G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus Legionella, p.107-108. In C. Thornsberry, *et al.* (ed.), Legionella: proceedings of the 2nd international symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. **Musher, D.M.** 1988. The gram positive cocci: I. Streptococci. Hospital practise. **23**(3):63-76.



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



Hologic N.V.
Da Vinciilaan 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.

102946F-01-EL Rev. 003 2018-03
©1990 - 2018 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.