

# TYRIMŲ RINKINYS TIESIOGINIAM AMPLIFIKUOTŲ TUBERKULIOZĖS MIKOBAKTERIJŲ APTIKIMUI

In Vitro diagnostiniam naudojimui (50 tyrimų rinkinys)  
(bioMérieux Kat.Nr. 39006 / Hologic Kat.Nr. 301001)

## **NAUDOJIMAS**

Hologic amplifikuotų tuberkuliozės mikobakterijų tiesioginio aptikimo rinkinys (MTD) yra taikinio nukleino rūgštį nustatantis tyrimas, skirtas *Mycobacterium tuberculosis* kompleksu rNRN *in vitro* diagnostiniam nustatymui sedimentuose, paruoštuose iš skreplių (surinktų priverstinai ar natūraliai atsikosint), bronchų mėginių (pvz. bronchoalveolinis lavažas ar bronchų aspiratai) ar trachėjos aspiratų.

## **ISPĖJIMAI**

Šio tyrimo veiksmingumas nebuvo įrodytas tiesioginiam *M. tuberculosis* rNRN aptikimui, naudojant kitus klinikinius mėginius (pvz. kraują, šlapimą ar išmatas). MTD tyrimo poveikis nėra nustatytas sedimentams, gautiems kitu, nei čia aprašytu būdu ar laikomiems kitokį laiko tarpą ar kitoje temperatūroje, nei nurodyta šiame pakuotės aprašyme.

Teigiami sedimentai turi būti kultivuojami, norint nustatyti ar mikobakterijos, kitokios nei tuberkuliozės kompleksas (MOTT), yra kartu su *M. tuberculosis* kompleksu bei tam, kad atlikti antimikobakterinio jautrumo tyrimą. Norint nustatyti, kurie *M. tuberculosis* komplekso porūšiai (pvz. *M. bovis*) yra mėginyje, turi būti atliktas AFB kultivavimas.

Nors klinikinio įvertinimo metu buvo atliktas tyrimas su pediatriniais pacientais, ŽIV teigiamais pacientais bei pacientais su MOTT infekcijomis, bendras pacientų skaičius buvo nepakankamas aiškiai nustatyti, jog nėra jokių statistinio atlikimo skirtumų tarp šių specifinių pacientų populiacijų.

MTD tyrimas nėra ištirtas dėl naudojimo su mėginiais, paimtais iš pacientų, kurie buvo gydomi antituberkuliozės agentais, bakteriologinio gydymo nustatymui ar reakcijos į terapiją stebėjimui. Kraujingi mėginiai negali būti naudojami MTD tyrimui.

## **ATSARGUMO PRIEMONĖS**

- A. Tik *in vitro* diagnostiniam naudojimui.
- B. MTD tyrimas yra specifiškas *M. tuberculosis* kompleksui, tačiau komplekso narių (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* ir *M. canetti*) nediferencijuoja (13). Į *M. celatum* ir *M. terrae* panašūs organizmai kryžmiškai reaguos esant koncentracijoms daugiau nei 30 kolonijas formuojančių vienetų (KFV). Tačiau organizmai, panašūs į *M. celatum* ir *M. terrae*, yra reti klinikiniai izoliatai.
- C. Neigiamas tyrimas neatmeta galimybės izoliuoti *M. tuberculosis* komplekso organizmą iš mėginio. Tyrimo rezultatus gali įtakoti mėginio surinkimas ir transportavimas, mėginių surinkimo kintamumas, laboratorijos procedūrinės klaidos, klaidingas mėginio identifikavimas bei nuorašų klaidos.
- D. *M. tuberculosis* komplekso narių identifikavimui naudokite sedimentus, tik paruoštus laikantis NALC-NaOH ar NaOH procedūrų, rekomenduojamų Ligų Kontrolės Centro (*angl.k.* Centers for Disease Control) (CDC)<sup>7</sup>. Tyrimui gali būti naudojamas tik koncentruoti sedimentai, paruošti iš skreplių (surinktų priverstinai ar natūraliai atsikosint), bronchų mėginių (pvz. bronchoalveolinis lavažas ar bronchų aspiratai) ar trachėjos aspiratų. Būkite atidūs resuspenduojant sedimentą fosfato buferyje, nes fosfato koncentracija turi būti 67 mM<sup>7</sup>.
- E. Venkite aptikimo reagentų I ir II kontakto su oda, akimis bei gleivine. Įvykus kontaktui su šiais reagentais, kontakto vietą gausiai praplaukite vandeniu. Įvykus šių reagentų išsiliejimui, prieš iššluostant, praskieskite juos vandeniu.
- F. Atliekant tyrimą, laikykitės universalių atsargumo priemonių<sup>4</sup>. Apdorotų ir nukenksmintų nuosėdų paruošimas ir MTD procedūros turi būti atliekamos laikantis Antro lygio Biologinio Saugumo nuostatų.
- G. Naudokite tik pateikiamą ar specifinę vienkartinę laboratorijos įrangą.

- H. Darbo vietos paviršiai, dozatoriai bei įranga turi būti nukenksminti nuo RNR amplikono balikliu, praskiedžiant santykiu 1:1 (1 dalis baliklio ir viena dalis vandens), kaip aprašyta TYRIMO PROCEDŪROJE. Po 15 minučių nuo darbo vietos paviršiaus nuvalykite baliklį.
- I. Atliekant šį tyrimą turi būti naudojamos teigiamo išstūmimo dozatoriai arba orą išstūmiantys dozatoriai su hidrofobiniais antgaliais. Pernešant lizatą iš lizavimo (Lysis) mėgintuvėlio į amplifikacijos mėgintuvėlį, turi būti naudojami prailginti hidrofobiškai užkimšti antgaliai. Kiekvienam reakcijos mėgintuvėliui naudokite naują vienkartinį antgalį. Nemojuokite dozatoriaus antgaliu su mėginiu virš mėgintuvėlių stovo. Panaudoti dozatoriaus antgaliai turi būti nedelsiant išmetami į atitinkamą biologiškai saugų atliekų konteinerį.
- J. Pakartotinai pridėdant reagentus po to, kai lizatas įdėtas į mėgintuvėlį, stenkitės nepaliesi mėgintuvėlio dozatoriaus antgaliu, taip sumažindami medžiagos pernešimą iš vieno mėgintuvėlio į kitą galimybę. Reagento srovė turi būti nukreipta į mėgintuvėlio vidinę sienelę, taip išvengiant taškymosi. Atsargus dozavimas yra labai svarbus norint išvengti užteršimo pernešimo.
- K. Ankstesnei ir vėlesnei amplifikacijai turi būti naudojami atskiri dozatoriai.
- L. Po reakcijos mėgintuvėlių nuskaitymo liuminometre, juos nukenksminkite ir utilizuokite laikydamiesi nurodymų, aprašytų TYRIMO PROCEDŪROJE ir PROCEDŪROS PASTABOSE tam, kad išvengti laboratorijos aplinkos užteršimo.
- M. Sandarinimo juostelės ir užspaudžiami kamšteliai turi būti išmetami į atitinkamą biologiškai saugų atliekų konteinerį, iškart juos nuėmus nuo reakcijų mėgintuvėlių. Naujos sandarinimo juostelės ir užspaudžiami kamšteliai turi būti visada naudojami tam, kad išvengti kryžminio užterštumo. Šių medžiagų NEGALIMA naudoti pakartotinai po ankstesnio etapo. Sandarinimo juostelės turi būti tvirtai fiksuotos ant visų reakcijų mėgintuvėlių.
- N. Inkubacijos metu neuždenkite vandens vonelių, ypač jei naudojate užspaudžiamus kamštelių. (Kondensacija yra galimas užterštumo šaltinis.)
- O. Tiksliems tyrimo rezultatams po Pasirinkimo Reagento (Selection Reagent) įdėjimo būtinas adekvatus vortekso tipo puktyklės naudojimas.
- P. Hibridizacijos apsaugos tyrimo (HPA) etapą rekomenduojama atlikti atskiroje patalpoje, norint sumažinti tyrimo užterštumo riziką. Ši vieta turi būti atskirta nuo mėginių ir reagentų paruošimo bei amplifikacijos vietų.
- Q. Norint išvengti laboratorijos užteršimo amplikonu, laboratorijoje turi vykti vienos krypties darbas. Pavyzdžiui, pradėti nuo mėginių ir reagentų paruošimo amplifikacijai, tada pereiti prie HPA vietų. Mėginiai, įranga ir reagentai turi būti grąžinti į tą vietą, kur buvo atliekamas ankstesnis etapas. Be to, personalas neturėti vaikščioti į ankstesnę darbo vietą be tinkamų antikontaminacinių apsaugos priemonių. Atliekant MTD tyrimą, griežtai rekomenduojama nenaudoti biologiškai saugaus kabineto, naudojamo mėginių paruošimui.

### Tyrimo santrauka ir paaiškinimas

MTD tyrimas naudoja Transkripciskai tarpininkaujančios amplifikacijos (*angl. Transcription-Mediated Amplification*) (TMA) ir Hibridizacijos apsaugos metodą (Hybridization Protection Assay) (HPA<sup>2</sup>) kokybiškam *M. tuberculosis* komplekso ribosominės ribonukleininės rūgšties (rRNR) aptikimui. MTD tyrimas aptinka rRNR iš kultivuojamų ir nekultivuojamų organizmų. *M. tuberculosis* kompleksui priklauso *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* ir *M. canetti* (12,13). MTD tyrimas skirtas aptikti organizmus, esančius *M. tuberculosis* komplekse. Nors *M. microti* infekuoja tik gyvūnus, *M. bovis* yra pernešamas nuo infekuotų gyvūnų žmonėms, o *M. africanum* sukelia plaučių ligas žmonėms tropinėje Afrikoje<sup>12</sup>. *M. tuberculosis* yra dažniausiai pasitaikantis komplekso narys, sukeliantis žmonių susirgimus visame pasaulyje. Pranešama, kad pastaruoju metu yra pastebėtas didelis tuberkuliozės, susijusios su AIDS, paplitimas užsieninės kilmės atvejuose ir padidėjęs pernešamumas aukštesnės rizikos populiacijose<sup>6,9</sup>. Taip pat pastebėtas pakilimas daugelyje *M. tuberculosis* padernių, kurios yra atsparios vienam ar daugiau antituberkuliozinių vaistų<sup>11</sup>.

Tradiciniai metodai gali aptikti tuberkuliozės augimą ne anksčiau kaip po 1 savaitės, tačiau gali užsitęsti iki 8 savaičių<sup>7,10</sup>. Palyginimui MTD tyrimas *M. tuberculosis* komplekso rRNR aptikimą atlieka per 2.5 - 3.5 valandos po tyrimo procedūros pradžios. Nors MTD tyrimas negali nustatyti jautrumo vaistams, jis gali greitai ir patikimai atlikti *M. tuberculosis* aptikimą. Tai paskatina imtis tinkamų izoliavimo priemonių, tinkamo terapijos taikymo ir ankstyvo susirgimo aptikimo bei sulaikymo nuo tolimesnio plitimo<sup>3</sup>.

**Procedūros principas**

MTD yra dviejų dalių tyrimas, kuriame amplifikacija ir aptikimas vyksta viename mėgintuvelyje. Iš pradžių nukleininės rūgštys yra išleidžiamos iš mikobakterinių ląstelių suardymo ultragarsu Karštis yra naudojamas nukleininės rūgščių denatūravimui ir rRNR antrinės struktūros suardymui. Transkripciskai tarpininkaujantis amplifikacijos (TMA) metodas naudoja pastovią 42°C temperatūrą, po to amplifikuojamas specifinis mikobakterinės rRNR taikiny transkribuojant tarpines DNR, ko pasekoje pasigamina daugybė mikobakterijų RNR amplikono kopijų.

*M. tuberculosis* komplekso specifinės sekos yra aptinkamos RNR amplikone, naudojant (HPA) metodą<sup>2</sup>. *Mycobacterium Tuberculosis* hibridizacijos reagento (Tuberculosis Hybridization Reagent) sudėtyje viengrandės DNR zondas, pažymėtą chemiluminescentine medžiaga. Šis zondas yra komplementarus *M. tuberculosis* komplekso specifinei sekai. Kai suformuojami stabilūs RNR:DNR hibridai tarp zondo ir specifinės sekos, hibridizuoti zondai yra aptinkami ir matuojami Leader™ luminometru.

**Reagentai (50 tyrimų rinkinys)**

**Pastaba:** Informacijos apie su reagentais susijusį pavojų ir atsargumo priemones ieškokite saugos duomenų lapų bibliotekoje (Safety Data Sheet Library), adresu [www.hologic.com/sds](http://www.hologic.com/sds).

Reagentai MTD tyrimui:

**Reagento pavadinimas****Tūris****TUBERKULIOZĖS MIKOBAKTERIJŲ AMPLIFIKAVIMO RINKINYS**

Mikobakterijų mėginio skiedimo buferis (SDB)	1 x 2.5 mL
<i>Tris buferio tirpalas, turintis &lt; 3% detergento</i>	
Tuberkuliozės mikobakterijų amplifikacijos reagentas (A)	1 x 3 mL
<i>Nukleininės rūgštys, liofilizuotos tris buferio tirpale, turinčiame 5% tūrio agento (angl. bulking agent)</i>	(atskiestas)
Mikobakterijų amplifikacijos buferis (AB)	1 x 3 mL
<i>Vandens tirpalas su konservantais</i>	
Mikobakterijų aliejinis reagentas (O)	1 x 10 mL
<i>Siloksano aliejus</i>	
Mikobakterijų fermentų reagentas (E)	1 x 1.5 mL
<i>Atvirkštinė transkriptazė ir RNR polimerazė, liofilizuota HEPES buferiniame trpale, turinčiame &lt; 10% tūrio agento ir &gt; 15 mM N-acetil-L-cisteino</i>	(atskiestas)
Mikobakterijų fermentų skiedimo buferis (EDB)	1 x 1.5 mL
<i>Tris buferio tirpalas, turintis surfaktantą ir glicerolio</i>	

**TUBERKULIOZĖS MIKOBAKTERIJŲ HIBRIDIZACIJOS RINKINYS**

Tuberkuliozės mikobakterijų hibridizacijos reagentas (H)	1 x 6 mL
<i>&lt; 100 ng/buteliukas neinfekuotas DNR zondas su chemiluminescentine medžiaga, liofilizuota suksinato buferio tirpale, turinčiame tūrio agento ir detergento</i>	(atskiestas) liofilizuotas
Mikobakterijų hibridizavimo buferis (HB)	1 x 6 mL
<i>Suksinato buferio tirpalas, turintis &lt; 4% detergento</i>	
Mikobakterijų žymėjimo reagentas (S)	1 x 15 mL
<i>Borato buferio tirpalas, turintis surfaktantą</i>	
Mikobakterijas lizuojantys mėgintuvėliai (LT)	2 x 25 mėgintuvėliai
<i>Stiklo rutuliukai, tūrio agentas</i>	

**Laikymas ir reikalavimai dirbant**

**A. Žemiau nurodyti skysti ar neatskiesti komponentai turi būti laikomi prie 2°C - 8°C ir yra stabilūs iki nurodytos galiojimo datos pabaigos.**

- Mikobakterijų mėginio skiedimo buferis (SDB), (*Mycobacterium Specimen Dilution Buffer*)
- Tuberkuliozės mikobakterijų amplifikacijos reagentas (A), (*Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent*)
- Mikobakterijų amplifikacijos buferis (AB), (*Mycobacterium Amplification Buffer*)

- Mikobakterijų fermentų reagentas (E), (*Mycobacterium Enzyme Reagent*)
- Mikobakterijų fermentų skiedimo buferis (EDB), (*Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer*)
- Tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagentas (H), (*Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent*)

Atskiestas Tuberkuliozės mikobakterijų amplifikacijos reagentas (A) (*Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent*) yra stabilus 2 mėnesius prie 2°C - 8°C. Tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagentas (H) (*Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent*) ir mikobakterijų fermentų reagentas (E) (*Mycobacterium Enzyme Reagent*) yra stabilus 1 mėnesį prie 2°C - 8°C po praskiedimo arba 2 mėnesius prie -20°C ar žemesnėje temperatūroje, jei laikomas užšalęs mėginio pirmojo praskiedimo dieną. Užšaldyti mėginiai turi būti naudojami tą pačią dieną po atšildymo. Bešerkšniai šaldytuvai neturėtų būti naudojami.

**B. Žemiau nurodyti komponentai yra stabilūs iki galiojimo datos pabaigos, jei yra laikomi prie 2°C - 25°C.**

- Mikobakterijų aliejinis reagentas (O), (*Mycobacterium Oil Reagent*)
- Mikobakterijų hibridizavimo buferis (HB), (*Mycobacterium Hybridization Buffer*)
- Mikobakterijų žymėjimo reagentas (S), (*Mycobacterium Selection Reagent*)
- Mikobakterijas lizuojantys mėgintuvėliai (LT), (*Mycobacterium Lysing Tubes*)

## MĖGINIO SURINKIMAS, LAIKYMAS, TRANSPORTAVIMAS IR APDOROJIMAS

### Mėginio surinkimas ir laikymas

Mėginiai, surinkti į sterilius plastikinius konteinerius, turi būti laikomi prie 2°C - 8°C iki transportavimo ar apdoravimo. Mėginiai, skirti klinikiniam ištyrimui, turi būti laikomi ne daugiau kaip 4 dienas (paprastai mažiau nei 24 valandas) prieš apdorojimą.

### Transportavimas:

Transportuokite mėginius į laboratoriją kaip įmanoma greičiau, laikantis atitinkamų reikalavimų.

### Apdorojimas (Nukenksminimas ir koncentravimas)

Kraujingi mėginiai negali būti naudojami MTD tyrimu. MTD tyrimas yra sukurtas rRNR aptikimui *M. tuberculosis* komplekse, panaudojant sedimentus, paruoštus pagal bendrai priimtinas dabartines NALC-NaOH ar NaOH nukenksminimo protokolų adaptacijas, aprašytas CDC, naudojant 1% - 1.5% NaOH 15 - 20 minučių ir centrifuguojant prie  $\geq 3,000 \times g^7$ .

### Apdoroto sedimento laikymas

Sedimentai gali būti laikomi prie 2°C - 8°C iki 3 dienų prieš tyrimo atlikimą. Sedimentai gali būti užšaldomi prie -20°C ar -70°C ir laikomi iki 6 mėnesių. Nenaudokite bešerkšnių šaldytuvų.

**MEDŽIAGOS****A. Pateikiamos medžiagos**

(bioMérieux Kat.Nr. 39006 / Hologic Kat.Nr. 301001) 50 tyrimų

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFIKAVIMO RINKINYS**

Mikobakterijų mėginio skiedimo buferis (SDB) (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer)	1 x 2.5 mL
Tuberkuliozės mikobakterijų amplifikavimo reagentas (A) (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent)	1 x 3 mL (atskiestas)
Mikobakterijų amplifikavimo buferis (AB) (Mycobacterium Amplification Buffer)	1 x 3 mL
Mikobakterijų aliejinis reagentas (O) (Mycobacterium Oil Reagent)	1 x 10 mL
Mikobakterijų fermentų reagentas (E) (Mycobacterium Enzyme Reagent)	1 x 1.5 mL (atskiestas)
Mikobakterijų fermentų skiedimo buferis (EDB) (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer)	1 x 1.5 mL

**TUBERKULIOZĖS MIKOBakterijų HIBRIDIZAVIMO RINKINYS**

Tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagentas (H) (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent)	1 x 6 mL (atskiestas)
Mikobakterijų hibridizavimo buferis (HB) (Mycobacterium Hybridization Buffer)	1 x 6 mL
Mikobakterijų žymėjimo reagentas (S) (Mycobacterium Selection Reagent)	1 x 15 mL
Mikobakterijų lizavimo mėgintuvėliai (LT) (Mycobacterium Lysing Tubes)	2 x 25 mėgintuvėliai
Sandarinimo juostelės	1 pakuotė

**B. Reikalingos, bet nepateikiamos medžiagos**

- Mikrodozatoriai, dozuojuojantys po 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, ir 450 µL
- Vortex tipo purtyklė
- Sterilus vanduo (filtruotas arba autoklavuotas)
- Kultūrų mėgintuvėliai
- Sterilūs 3 mm stiklo rutuliukai
- Mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai užsukamais kamšteliais
- Amplifikacijos teigiamos ląstelių kontrolės (pvz., *M. tuberculosis*, ATCC 25177 ar ATCC 27294)
- Amplifikacijos neigiamos ląstelių kontrolės (pvz., *M. gordonae*, ATCC 14470, ar *M. terrae*, ATCC 15755)
- Buitinis baliklis (5.25% hipochlorito tirpalas)
- Plastikiniai laboratorijos darbastalių dangalai
- 1000 µL dozatoriaus antgaliai su hidrofobiniais kamštukais

**C. Papildomos medžiagos, kurias galite įsigyti per savo Hologic atstovą:**

Leader 50i Liuminometras (bioMérieux Kat.Nr. 39400 / Hologic Kat.Nr. 103100i)

Sonikatorius (bioMérieux Kat.Nr. 39409 / Hologic Kat.Nr. 901104)

Aptikimo reagentų rinkinys (bioMérieux Kat.Nr. 39300 / Hologic Kat.Nr. 201791)

MTD Amplifikacijos kontrolės (bioMérieux Kat.Nr. 39223/Hologic Kat.Nr. 301043F)

Sauso karščio vonelė<sup>A</sup> (42° ± 1°C, 60° ± 1°C, ir 95° ± 5°C) (bioMérieux Kat.Nr. 39405, 39406, 39407 / Hologic Kat.Nr. 105524, 105524F, 105524J)

Sonikatoriaus stovas (bioMérieux Kat.Nr. 39313 / Hologic Kat.Nr. 104027)

Tyrimo mėgintuvėlių stovai (bioMérieux Kat.Nr. 39311 / Hologic Kat.Nr. 104769)

Prailginti dozatorių antgaliai su hidrofobiniais kamštukais (1250 µL) (bioMérieux Kat.Nr. 39315 / Hologic Kat.Nr. 104316)

Mėgintuvėliai, polipropilenas, 12 x 75 mm (bioMérieux Kat.Nr. 39308 / Hologic Kat.Nr. 102440)

Užspaudžiami polipropileno kamšteliai, skirti 12 x 75 mm mėgintuvėliams (bioMérieux Kat.Nr. 39320 / Hologic Kat.Nr. 400713)

**TYRIMO PROCEDŪRA****Kontrolės**

Laštelės, naudojamos amplifikacijos teigiamai lašelių kontrolei, turi būti *M. tuberculosis* komplekso narės, tokios kaip avirulentinė H37Ra (ATCC 25177) ar virulentinė H37Rv (ATCC 27294). Laštelės, naudojamos neigiamai lašelių kontrolei, turi būti MOTT, pvz. tokios kaip *M. gordonae* (ATCC 14470) ar *M. terrae* (ATCC 15755). Kontrolės turi būti ruošiamos prieš mėginio tyrimą.

Lašelių kontrolės privalo turėti 25 - 150 KfV 50 µL, kad galutinė koncentracija būtų 1 - 10 KfV vienam tyrimui. Ši koncentracija turi būti patvirtinta kultivuojant. Šios lašelių kontrolės bus utilizuojamos mėginio apdorojimo kontrolių paruošimo metu (žr. mėginio paruošimą).

**1. Rekomenduojamas lašelių kontrolių paruošimas**

- a. Įdėkite 3 - 5 sterilius 3 mm stiklo rutuliukus į švarų kultūros mėgintuvėlį.
- b. Įlašinkite 1-2 mL sterilaus vandens. Pridėkite keletą 1 µL dydžio augimo kilpučių iš atitinkamos kultūros. Užkimškite mėgintuvėlį ir pakartotinai purtykite vortex tipo purtyklėje dideliu greičiu.
- c. Leiskite suspensijai nusistovėti 15 minučių.
- d. Perneškite supernatantą į švarų kultūros mėgintuvėlį. Nustatykite drumstumą, ekvivalentišką #1 McFarland nefelometro standartui, naudodamiesi McFarland referencija.
- e. Suspensiją atskieskite santykiu 1:100, pridėdant 100 µL #1 McFarland suspensijos į 10 mL sterilaus vandens. Užkimškite ir purtykite vortex tipo purtyklėje. Tai yra 1 skiedimas.
- f. Atlikite antrą skiedimą santykiu 1:100, pridėdant 100 µL 1 skiedimo į 10 mL sterilaus vandens. Užkimškite ir purtykite vortex tipo purtyklėje. Tai yra 2 skiedimas. Šis tirpalas turi turėti apie 25 - 150 CFU į 50 µL.

**Išpilstymas ir lašelių kontrolių laikymas**

- a. Atskiestos medžiagos turi būti išpilstytos į švarius 1.5 mL mikrocentrifuginius mėgintuvėlius užsukamais kamšteliais, kaip vienkartinio naudojimo kiekiai (500 µL) ir laikomi užšaldyti prie -20°C 6 mėnesius arba prie -70°C 1 metus. Bešerkšniai šaldytuvai negali būti naudojami.

Tyrimas, atliekamas rekomenduojama *M. tuberculosis* lašelių teigiama kontrole, aptinka tik reagentų netinkamą veikimą. Teigiama kontrolė yra sukurta stebėti reagentų veiklą apdorojimo metu dėl aOH ir fosfato buferio pertekliaus. Procedūrinės laiko ar temperatūrų variacijos, kurios gali įtakoti amplifikacijos efektyvumą ar pasirinkimo laiko adekvatiškumą, gali būti neaptinkamos naudojant rekomenduojamas lašelių kontroles. Pagal gaires ar specialius nurodymus galite naudoti papildomas kontroles.

**2. Mėginių inhibicijos kontrolės**

Jei MTD tyrimas yra neigiamas, o terapeutas įtaria, kad pacientas serga tuberkulioze, mėginio inhibiciją galima patikrinti naudojant šią procedūrą:

- a. Įlašinkite 50 µL mėginio skiedimo buferio į 2 Mycobacterium lizavimo mėgintuvėlius (LT) (užsėtus ir neužsėtus).
- b. Įlašinkite 50 µL amplifikacijos teigiamos lašelių kontrolės ir 450 µL sedimento į 1 mėgintuvėlį (užsėtą). Pridėkite 450 µL sedimento į antrą mėgintuvėlį (neužsėtą). Tęskite tyrimą kaip įprasta.

**Interpretavimas**

Jei užsėto mėgintuvėlio RLU vertė yra  $\geq 30,000$ , mėginys neinhibuoją amplifikacijos, o tai reiškia, kad nebuvo jokio galimo taikinio amplifikacijai. Jei užsėto mėgintuvėlio RLU vertė yra žemesnė nei 30,000, mėginys inhibuoją amplifikaciją, taigi, galite vertinti kitą mėginį. Jei pakartotinis neužsėto mėginio tyrimo rezultatas yra teigiamas, MTD tyrimo rezultatai galima interpretuoti kaip teigiamą. Dažniausias šio tipo rezultatų paaiškinimas yra atsitiktinis mėginių surinkimo kintamumas (*angl. random sampling variability*), t.y. pirmas kiekis neturi amplifikacijos taikinio, o antras mėginio kiekis turi jį. Neužsėto mėgintuvėlio RLU vertė gali būti teigiama arba neigiama, nes sedimento kiekis turi arba neturi *M. tuberculosis* rRNR.

**3. Laboratorijos užterštumo stebėjimo kontrolė**

Laboratorijos užterštumo dėl amplikono ar *M. tuberculosis* lašelių stebėjimo, galite atlikti šią procedūrą:

- a. Įlašinkite 1 mL sterilaus vandens į švarų mėgintuvėlį. Sudrėkinkite sterilų poliesterio ar dakrono tamponą steriliu vandeniu.
- b. Nuvalykite stalą ar įrangą, kurią norite tirti.
- c. Panardinkite tamponą į vandenį ir lengvai pasukiokite. Išimkite tamponą gręždami jį į mėgintuvėlio sienelę. Išmeskite tamponą į konteinerį, kuriame yra baliklio, praskiesto santykiu 1:1.



- d. Įlašinkite 25 µL vandens su išgręžta tampono medžiaga į amplifikacijos mėgintuvėlį, kuriame yra 50 µL amplifikacijos reagento ir 200 µL aliejinio reagento.
- e. Laikykitės TYRIMO PROCEDŪROS nurodymų, atliekant amplifikaciją ir aptikimą.

#### Interpretavimas

Jei rezultatai yra  $\geq 30,000$  RLU, paviršius yra užterštas ir turi būti nukenksmintas balikliu, kaip rekomenduojama TYRIMO PROCEDŪROJE, įrangos paruošimo skiltyje. Jei yra įtariamas vandens vonelės užterštumas, amplifikuokite 25 µL vandens vonelės vandens, naudodami tą pačią procedūrą kaip ir gręžiamam tamponui, neįnešant antimikrobinų priemonių, naudojamų vandens vonelėje.

### Įrangos paruošimas

1. Optimaliam garsinės energijos pernešimui į sonikatorių, vanduo turi būti visiškai degazuotas pagal žemiau nurodytą procedūrą prieš kiekvieną paleidimą:
  - a. Įpilkite pakankamai aplinkos temperatūros vandens iš čiaupo, kad pripildytumėte sonikatoriaus vonelę iki 1/2 colio iki rezervuaro viršaus.
  - b. Įjunkite sonikatorių 15 minučių, kad vanduo būtų visiškai degazuotas.
2. Nustatykite 1 sauso karščio vonelę ties 95°C, 1 sauso karščio vonelę ties 60°C, o trečią sauso karščio vonelę ar vandens vonelę ties 42° ± 1°C.
3. Nušluostykite darbastalių paviršius, įrangą ir dozatorius, naudodami buitinį baliklį, praskiestą santykiu 1:1 prieš kiekvieną procedūrą. Baliklis turi kontaktuoti su paviršiumi mažiausia 15 minučių. Darbo vietos paviršius nuvalykite vandeniu, kad pašalintumėte baliklį. Paviršių, ant kurio bus atliekamas darbas, uždenkite plastikiniu laboratorijos apdangalu.
4. Paruoškite Leader liuminometrą darbui. Įsitinkite, kad jame yra pakankami kiekiai I ir II aptikimo reagento. Žiūrėkite instrumento naudojimo instrukciją dėl tolimesnių nurodymų įkeliant aptikimo reagentus (aptikimo reagentai yra parduodami atskirai).

### Reagentų paruošimas

Atskiesite liofilizuoto tuberkuliozės mikobakterijų amplifikavimo reagento (Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent) buteliuką (A) (50 tyrimų) su 3.0 mL mikobakterijų amplifikavimo buferiu (AB) (Mycobacterium Amplification Buffer). Purtykite Vortex tipo purtyklėje, kol tirpalas gerai susimaišys. Leiskite *atskiestam* reagentui pabūti kambario temperatūroje, kol jis taps skaidrus. Atskiestas tuberkuliozės mikobakterijų amplifikavimo reagentas turi būti laikomas prie 2° - 8°C iki 2 mėnesių. Prieš naudojimą atskiestam tuberkuliozės mikobakterijų amplifikavimo reagentui leiskite sušilti iki kambario temperatūros.

### Mėginio paruošimas

1. Pažymėkite reikiamą kiekį mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlių (LT) mėginių tyrimui ir po 1 amplifikavimo ląstelių teigiamą ir neigiamą arba mėginio apdoravimo teigiamą ir neigiamą kontroles. Nuimkite kamštelius, bet jų neišmeskite.
2. Dozuokite po 50 µL mikobakterijų mėginio skiedimo buferio (SDB) (Mycobacterium Specimen Dilution Buffer) į visus mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlius (LT) (Mycobacterium Lysing Tubes). Laikykitės žemiau pateiktų nurodymų A arba B dėl kontrolių ir C dėl mėginių.
  - a. Mėginių apdoravimo kontrolės:

Į kiekvieną kontrolę įlašinkite 1 mL NALC/NaOH tirpalo ir 3 mL fosfato buferio, naudojamo seilių apdorojimui su 1 mL sterilus vandens į mėginio apdoravimo mėgintuvėlį.

    - i. Sumaišykite naudodami Vortex tipo purtyklę.
    - ii. Įlašinkite 450 µL NALC/NaOH/fosfato buferio ir 50 µL ląstelių kontrolės skiedinio į atitinkamai pažymėtą mikobakterijas lizuojantį mėgintuvėlį (LT).
  - b. Jei yra naudojamos amplifikacijos ląstelių kontrolės, perneškite 450 µL amplifikavimo ląstelių kontrolės iš konteinerio į atitinkamai pažymėtą mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlį (LT).

- c. Mėginys: \ perneškite 450 µL nukenksminto, gerai sumaišyto mėginio iš konteinerio į atitinkamai pažymėtą mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlį (LT).
3. Po mėginių įdėjimo užkimškite mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlius (LT).
4. Purtykite 3 sekundes, naudodami Vortex tipo purtyklę.

### Mėginio lizavimas

1. Įstatykite mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlius (LT) į sonikatoriaus stovą taip, kad reakcijos mišinys mėgintuvėlių dugne būtų paniręs, tačiau mėgintuvėlių kamšteliai būtų virš vandens. Pastatykite sonikatoriaus stovą ant vandens vonelės sonikatoriaus. MĖGINTUVĖLIAI NEGALI LIESTIS SU SONIKATORIAUS DUGNU AR ŠONAIŠ.
2. Sonikatoriuje laikykite 15 minučių ( ne daugiau 20 minučių). Sonikuoti mėginiai ir kontrolės dabar yra "lizatai". LIZATŲ NEPURTYKITE.

### Amplifikavimas

1. Pažymėkite amplifikavimo mėgintuvėlius (12 x 75 mm polipropileno mėgintuvėliai) ant mėgintuvėlio viršaus skaičiais, kurie atitinka skaičius, pažymėtus ant mikobakterijų lizavimo mėgintuvėlių (LT). Taipogi pažymėkite amplifikavimo mėgintuvėlius kiekvienai amplifikavimo ląstelių teigiamai ir neigiamai kontrolėms. Jei RNR kontrolės yra naudojamos, pažymėkite amplifikavimo mėgintuvėlius atitinkamai neigiamai ir teigiamai kontrolėms.
2. Tuo pačiu dozatoriumi įlašinkite 50 µL *atskiesto* tuberkuliozės mikobakterijų amplifikavimo reagento į kiekvieno amplifikavimo mėgintuvėlio dugną. Tuo pačiu dozatoriumi įlašinkite 200 µL mikobakterijų aliejinio reagento (O) (Mycobacterium Oil Reagent) į kiekvieną amplifikavimo mėgintuvėlį.
3. NEPURTYKITE LIZATO. Perneškite 25 µL lizato į tinkamai pažymėto amplifikavimo mėgintuvėlio dugną naudodami dozatorių su vis nauju prailgintu hidrofobiškai užkimštu antgaliu kiekvienam pernešimui. Likęs lizatas gali būti laikomas prie 2°C - 8°C iki 7 dienų arba jei yra laikomas prie -20°C – iki 1 mėnesio. Nenaudokite bešerkšnių šaldytuvų. Jei reikia atlikti papildomą paciento mėginio lizato tyrimą, sušildykite laikomą lizatą iki kambario temperatūros. LIZATO NEPURTYKITE.
4. Mėgintuvėlius inkubuokite prie 95°C 15 minučių, bet ne daugiau nei 20 minučių sauso karščio vonelėje.
5. Paruoškite fermentų mišinį, pridėdami 1.5 mL mikobakterijų fermentų skiedimo buferio (EDB) (Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer) į liofilizuotą mikobakterijų fermentų reagentą (E) (Mycobacterium Enzyme Reagent). Sumaišykite, bet nepurtykite. *Atskiestas* fermento reagentas yra stabilus 1 mėnesį, jei yra laikomas prie 2°C - 8°C arba 2 mėnesius prie -20°C, jei yra laikomas kaip užšaldytas kiekis<sup>B</sup> pirminio skiedimo dieną. Jei tiriate su užšaldytais fermentų kiekiais, pirmiausia įneškite juos į kambario temperatūrą; neatšildykite jų aukštoje temperatūroje. Atšilusius fermentų kiekius sumaišykite švelniai aspiruodami ir išstumdami mišinį tuo pačiu dozatoriumi prieš dedant į amplifikavimo mėgintuvėlius.
6. Perneškite mėgintuvėlius į 42° ± 1°C sauso karščio vonelę ar vandens vonelę ir leiskite atvėsti 5 minutes. NEVĖSINKITE MĖGINTUVĖLIŲ KAMBARIO TEMPERATŪROJE. NEUŽDENKITE VANDENS VONELĖS.
7. Įlašinkite 25 µL fermentų mišinio į kiekvieną amplifikavimo mėgintuvėlį, naudodami tą patį dozatorių, kol mėgintuvėliai yra 42° ± 1°C. Papurtykite, kad gerai susimaišytų. Inkubuokite prie 42°C 30 minučių, bet ne daugiau nei 60 minučių. Šiame inkubavimo etape naudokite sandarinimo juosteles arba užspaudžiamus kamštelius. NEUŽDENKITE VANDENS VONELĖS.
8. Mėgintuvėliai gali būti uždengti ir laikomi prie 2°C - 8°C iki 2 valandų arba prie -20°C nakčiai po 30 minučių inkubacijos. Jei mėgintuvėliai yra laikomi prie -20°C per naktį, jie turi būti visiškai atšildomi kambario temperatūroje (arba ne didesnėje nei 60°C) prieš hibridizacijos etapą. Jei laikote per naktį, geriau naudokite užspaudžiamus kamštelius.



### Hibridizavimas

1. Atskieskite liofilizuotą tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagentą (H) (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) su 6 mL mikobakterijų hibridizavimo buferiu (HB) (Mycobacterium Hybridization Buffer). Tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagentas (H) ir mikobakterijų hibridizavimo buferis (HB) prieš atskiedimą turi būti laikomi kambario temperatūroje. Jei mikobakterijų hibridizavimo buferis (HB) buvo laikomas šaldytuve, sušildykite jį prie 60°C lengvai pamaišydami, kad užtikrinti, jog visi komponentai yra tirpale. Purtykite naudodami Vortex tipo purtyklę, kol tirpalas taps skaidrus (apie 1 minutę). *Atskiestas* hibridizavimo reagentas yra stabilus 1 mėnesį, jei yra laikomas prie 2°C - 8°C arba du mėnesius, jei yra laikomas prie -20°C ir yra užšaldytas kaip mažas kiekis<sup>C</sup> pradinio skiedimo dieną. Jei *atskiestas* hibridizavimo reagentas buvo laikomas šaldytuve arba buvo užšaldytas, sušildykite jį prie 60°C lengvai pamaišydami, kad užtikrinti, jog visi komponentai yra tirpale.
2. Pridėkite 100 µL *atskiesto* hibridizavimo reagento į kiekvieną mėgintuvėlį, naudodami tą patį dozatorių. Užsandarinkite mėgintuvėlius sandarinimo juostelėmis arba užspaudžiamais kamšteliais. Purtykite naudodami Vortex tipo purtyklę 3 kartus **mažiausiai** 1 pilną sekundę<sup>D</sup> kaskart vidutiniu greičiu. Tam, kad pasiekti tinkamą susimaišymą reakcijų mėgintuvėliuose, laikykite mėgintuvėlius stačiai ir leiskite reakcijos mišiniui pasiekti viršutinę mėgintuvėlio sienelės pusę purtymo procedūros metu. (Neleiskite reakcijos mišiniui kontaktuoti su sandarinimo juoste ar kamšteliu, taip išvengiant užteršimo pavojaus). Po adekvataus purtymo, reakcijos mišinys turi būti vienodai geltonai.
3. Inkubuokite prie 60°C 15 minučių (ne daugiau 20 minučių) sauso karščio vonelėje arba vandens vonelėje.

### Atranka

1. Prieš pradėdant tyrimą, mikobakterijų žymėjimo reagentas (S) (Mycobacterium Selection Reagent) turi būti laikomas kambario temperatūroje. Išimkite mėgintuvėlius iš 60°C vandens vonelės ar sauso karščio vonelės ir pridėkite 300 µL mikobakterijų pasirinkimo reagento (S), naudodami tą patį dozatorių. Užsandarinkite mėgintuvėlius sandarinimo juostelėmis arba užspaudžiamais kamšteliais. Purtykite naudodami Vortex tipo purtyklę 3 kartus **mažiausiai** 1 pilną sekundę<sup>D</sup> kaskart vidutiniu greičiu. Tam, kad pasiekti tinkamą susimaišymą reakcijų mėgintuvėliuose, laikykite mėgintuvėlius stačiai ir leiskite reakcijos mišiniui pasiekti viršutinę mėgintuvėlio sienelės pusę purtymo procedūros metu. (Neleiskite reakcijos mišiniui kontaktuoti su sandarinimo juoste ar kamšteliu, taip išvengiant užteršimo pavojaus). Po adekvataus purtymo, reakcijos mišinys turi būti vienodai rožinis.
2. Mėgintuvėlius inkubuokite prie 60°C 15 minučių (ne daugiau 16 minučių) sauso karščio vonelėje arba vandens vonelėje.
3. Išimkite mėgintuvėlius iš sauso karščio vonelės arba vandens vonelės. Atvėsinkite mėgintuvėlius kambario temperatūroje laikydami juos mažiausiai 5 minutes, bet ne daugiau nei 1 valandą. Prieš atrankos procedūrą, nuimkite sandarinimo juosteles arba kamštukus.

### Detekcija

1. Pasirinkite tinkamą protokolą iš liuminometro programinės įrangos meniu. Naudokite 2 sekundžių nuskaitymo laiką.
2. Naudodami drėgną audeklą ar nemedvilninį popierinį rankšluostį, nušluostykite kiekvieną mėgintuvėlį, kad ant jo išorės neliktų nuosėdų. Įdėkite mėgintuvėlį į liuminometrą laikydamiesi instrumento instrukcijoje esančių nurodymų. Mėgintuvėliai yra nuskaitymi per 1 valandą 3 pasirinkimo etape.
3. Pasibaigus analizei, išimkite mėgintuvėlius iš liuminometro.
4. Po reakcijų mėgintuvėlių nuskaitymo, atsargiai pripildykite juos iki viršaus buitiniu balikliu, atskiestu santykiu 1:9. Leiskite nusistovėti mažiausiai 1 valandą prieš išmetimą. Tai padės išvengti laboratorijos įrangos užterštumo apmlikonu.
5. Tyrimo mėgintuvėlių stovai, įskaitant stovus, naudojamus mėginiams ir tyrimui, turi būti nukenksminti visiškai juos panardinant į buitinį baliklį, atskiestą santykiu 1:1 ir palaikant jame mažiausiai 15 minučių. Po to baliklis turi būti nuplaunamas vandeniui, o stovai – nušluostomi arba paliekami išdžiūti.
6. Laboratorijos paviršius ir įrangą nukenksminkite naudodami buitinį baliklį, praskiestą santykiu 1:1.

**Pakartotinis tyrimas**

1. Jei reikia atlikti pakartotinį paciento mėginio lizato tyrimą, įneškite paruoštą lizatą į kambario temperatūrą. NEPURTYKITE LIZATO.
2. Laikykitės TYRIMO PROCEDŪROS protokolo, pradedant nuo amplifikacijos etapo.

**Procedūros pastabos****A. Reagentai**

1. Fermentų reagentas turi būti laikomas kambario temperatūroje daugiau nei 15 minučių po atskiedimo.
2. Mikobakterijų hibridizavimo buferyje (HB) (Mycobacterium Hybridization Buffer) gali atsirasti nuosėdų. Sušildymas ir maišymas ar *atskiesto* hibridizavimo reagento atšildymas prie 60°C ištirpdyt nuosėdas.

**B. Temperatūra**

1. Aplifikacijos, hibridizavimo ir atrankos reakcijos priklauso nuo temperatūros; įsitikinkite, kad vandens vonelė ar sauso karščio vonelė yra nurodytos temperatūros ribose.
2. Mėgintuvėliai turi būti atvėsinti prie 42°C 5 minutes prieš fermentų mišinio įdėjimą optimaliam aplifikacijos atlikimui.
3. Aplifikacijai temperatūra yra labai svarbi (42° ± 1°C).

**C. Laikas**

Labai svarbu, kad būtų laikomasi laiko nurodymų, pateiktų TYRIMO PROCEDŪROJE.

**D. Vandens vonelė**

1. Vandens lygis vonelėje turi būti išlaikytas, kad užtikrinti mėgintuvėlyje esančio viso skysčio panirimą vandenyje, tačiau vanduo neturi patekti į mėgintuvėlius.
2. Aplifikacijos etape vandens vonelės negalima uždengti, nes kondensatas gali kristi ant mėgintuvėlių.

**E. Purtymas**

Labai svarbu, kad mišinys būtų homogeniškas hibridizavimo ir pasirinkimo etapuose, ypačiai po atskiesto tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagento (H) (Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent) įdėjimo (reakcijos mišinys bus vienodai geltonas) ir po mikobakterijų žymėjimo reagento (S) (Mycobacterium Selection Reagent) įdėjimo (reakcijos mišinys bus vienodai rožinis).

Purtymas yra tirpalo manipuliacija, kurios metu yra išgaunama vienoda suspensija. Kai reagentai yra tyrimo mėgintuvėliuose, išorinės energijos šaltinio poveikio metu aplink mėgintuvėlio ašį vyksta greitas tirpalo sukimasis. Šio proceso išdavoje yra gaunama vienoda tyrimo suspensija. Purtymo proceso metu mėgintuvėliai turi būti vertikaliaje pozicijoje, su atrama į viršutinę dalį. Jei yra atliekamas adekvatus purtymas, suspensija sukasi ratu, o tirpalas pakyla iki viršutinės mėgintuvėlio dalies. Hibridizavimo ir pasirinkimo etapų metu ši manipuliacija yra taikoma 3 kartus iš eilės, o purtymas yra kaskart atliekamas mažiausiai 1 pilną sekundę.

**TYRIMO INTERPRETAVIMAS**

Jei yra atliekamas tyrimas, naudojant Hologic Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) tyrimą, tyrimo rezultato interpretacija yra grindžiama pradiniu neigiamu rezultatu (< 30,000 RLU), pradiniu teigiamu rezultatu (≥ 500,000 RLU), arba pirminiu abejotinu rezultatu (nuo 30,000 iki 499,999 RLU). MTD tyrimas turi būti kartojamas su saugomu lizatu, kai pirminis tyrimo rezultatas yra abejotinas. Jei pakartotinio tyrimo su lizatu rezultatas yra > 30,000, rezultatas yra laikomas teigiamu.

**A. Kokybės kontrolės rezultatai ir priimtinumai**

Kontrolės turi duoti žemiau nurodytas vertes:

- Amplifikacijos ląstelių neigiama kontrolė < 20,000 RLU
- Amplifikacijos ląstelių teigiama kontrolė ≥ 500,000 RLU
- Mėginio apdoravimo neigiama kontrolė < 20,000 RLU

- Mėginio apdorojimo teigiama kontrolė  $\geq 1,000,000$  RLU

Paciento tyrimo rezultatai turi būti nepateikiami, jei MTD tyrimo kontrolių vertės neatitinka aukščiau nurodytų kriterijų. Žiūrėkite KLAIDŲ APTIKIMĄ dėl išsamesnės informacijos.

Kontrolių taikinio vertės turi būti nustatomos kiekvienoje laboratorijoje naudojant kiekvienos serijos paruoštų kontrolių tyrimo rezultatus.

#### B. Paciento tyrimo rezultatai

Jei kontrolės neatitinka tikėtinų rezultatų, pacientų mėginių rezultatai neturi būti užskaitomi to paties tyrimo serijoje.

##### Rezultatai:

- $\geq 500,000$  RLU teigiamas dėl *M. tuberculosis* komplekso rRNR
- $< 30,000$  RLU neigiamas dėl *M. tuberculosis* komplekso rRNR
- 30,000 to 499,999 RLU tikėtina, kad *M. tuberculosis* komplekso rRNR yra teigiamas; pakartokite tyrimą rezultatų užtikrinimui:

Pakartokite  $\geq 30,000$  RLU teigiamo dėl *M. tuberculosis* komplekso rRNR

Pakartokite  $< 30,000$  RLU neigiamo dėl *M. tuberculosis* komplekso rRNR

### REZULTATŲ PRANEŠIMAS

MTD tyrimo rezultatai turi būti interpretuojami atsižvelgiant į kitus laboratorinius ir klinikinius duomenis. Jei yra klinikinis įtarimas, apsvarstykite papildomo mėginio tyrimo galimybę.

Jei pirminis MTD tyrimo rezultatas yra teigiamas prie  $\geq 500,000$  RLU, ar pakartotinio MTD tyrimo rezultatas yra teigiamas prie  $\geq 30,000$  RLU, praneškite:

Ataskaita:	tuberkuliozės mikobakterijų komplekso rRNR aptiktas. AFB tepinėlis (teigiamas arba neigiamas).
Papildoma informacija :	AFB kultūra neaiški. Mėginys gali turėti ir MOTT, ir <i>M.tuberculosis</i> ar vien tik <i>M.tuberculosis</i> . Šis tyrimas negali būti vienintelis pagrindas, diagnozuojant tuberkuliozę. Teigiamą numanoma vertė paciento neigiamam tepinėliui yra žemesnė nei teigiamo tepinėlio. Tai yra labai svarbu tyrimo populiacijoms, kuriose tuberkuliozės vyravimas yra žemas, o teigiamos numanomos diagnostinių metodų vertės yra atitinkamai sumažintos.

Jei pirminis ar pakartotinis MTD tyrimo rezultatas yra neigiamas prie  $< 30,000$  RLU, praneškite:

Ataskaita:	tuberkuliozės mikobakterijų komplekso rRNR aptiktas. AFB tepinėlis (teigiamas arba neigiamas).
Papildoma informacija:	tuberkuliozės mikobakterijų komplekso rRNR nėra aptiktas. AFB kultūra neaiški. Mėginys gali neturėti <i>M.tuberculosis</i> , rezultatas gali būti klaidingai neigiamas dėl mažo <i>M.tuberculosis</i> skaičiaus ar MOTT nebuvimo arba dėl tyrimo interferencijos mėginių inhibitoriais. Rekomenduojamas kito paciento mėginio tyrimas, jei yra įtariama aktyvi tuberkuliozės forma arba mėginio inhibitorius.

### Apribojimai

Naudokite tik *M. tuberculosis* komplekso narių aptikimui, panaudojant sedimentus, paruoštus pagal NALC-NaOH ar NaOH procedūras, rekomenduojamas CDC<sup>7</sup>. Šis tyrimas gali būti naudojamas tik su sedimentais, paruoštais iš skreplių (surinktų priverstinai ar natūraliai atsikosint), bronchų mėginių (pvz. bronchoalveolinis lavažas ar bronchų aspiratai) ar trachėjos aspiratų.

MTD tyrimas yra specifinis, tačiau nediferencijuoja *M. tuberculosis* komplekso narių, t.y. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* ir *M. canetti*, o į *M. terrae* panašūs organizmai kryžmiškai reaguos prie koncentracijų, didesnių nei 30 KfV tyrimui. Tačiau organizmai, panašūs į *M. celatum* ir *M. terrae*, yra reti kliniškai izoliatai.

Tyrimo rezultatus gali įtakoti mėginio surinkimas ir transportavimas, mėginių surinkimo kintamumas, laboratorijos procedūrinių klaidos, klaidingas mėginio identifikavimas bei nuorašų klaidos.

Neigiamas tyrimas neatmeta galimybės izoliuoti *M. tuberculosis* komplekso organizmą iš mėginio.

#### Tikėtinos vertės

##### A. Klinikiuose tyrimuose stebėtos kontrolinių verčių ribos

RLU ribos kontrolėms stebėtos 7 vietose:

	RLU (N=704)	
	Ribos	Vidutinė
Amplifikacijos ląstelių teigiama kontrolė	Nuo 556,245 iki >2,000,000	>2,000,000
Amplifikacijos ląstelių neigiama kontrolė	Nuo 904 iki 18,754	3,041

##### B. Klinikinių mėginių RLU vertės

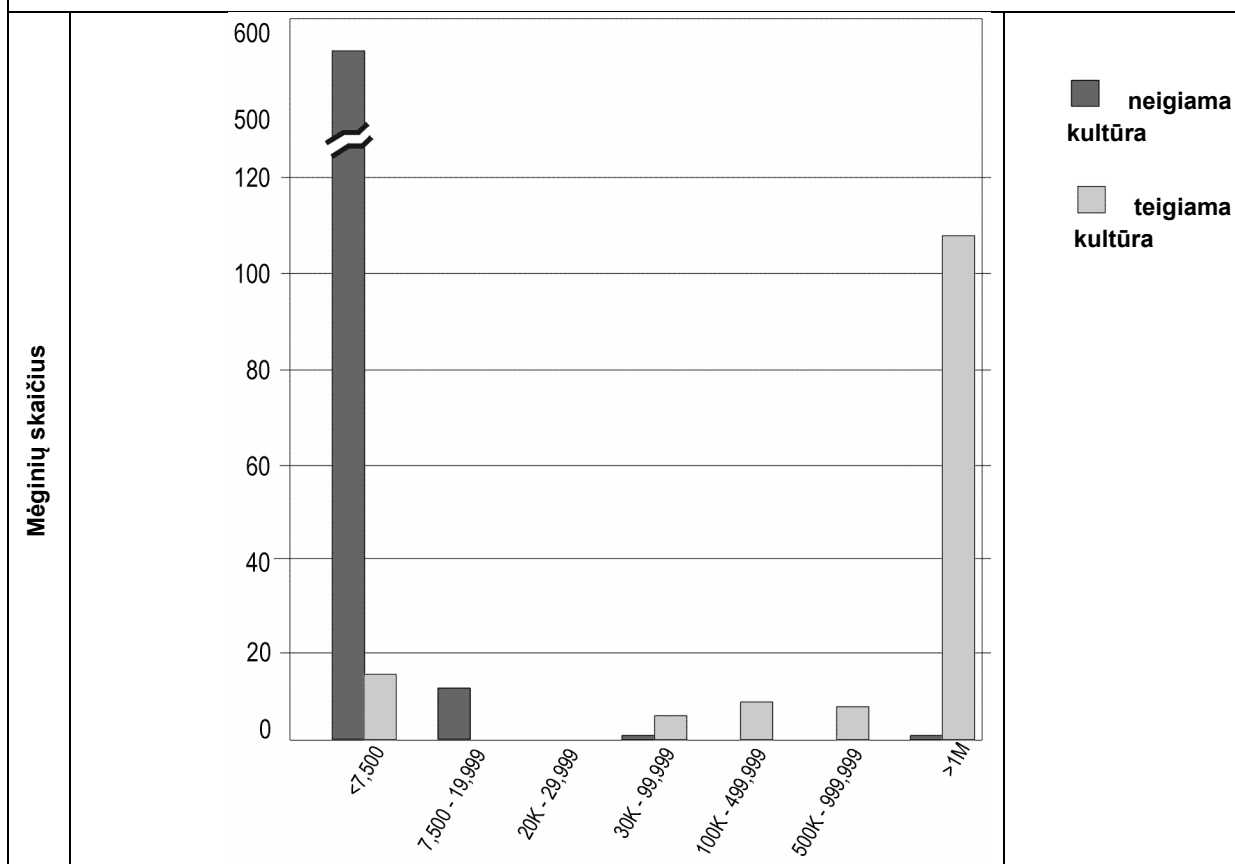
127 mėginių, kurie buvo MTD tyrime teigiami, RLU verčių ribos buvo nuo 35,777 iki > 2,000,000 RLU.

577 mėginių, kurie buvo MTD tyrime neigiami, verčių ribos buvo nuo 573 iki 19,176 RLU.

Visų šių mėginių RLU verčių dažnumo pasiskirstymas yra pavaizduotas žemiau: skirtingas išsiskaidymas yra dėl kitų teigiamų k

Negydytų pacientų rezultatų pasiskirstymas (tirta 7 vietose)

N=704



Kultūrų rezultatai

M.tuberculosis NEIG	554	10	0	1	0	0	1
M.tuberculosis TEIG	13	0	0	4	7	6	108

**ATLIKIMO CHARAKTERISTIKA****A. Klinikinis įvertinimas**

MTD tyrimas buvo įvertintas 6 vietose lyginant AFB tepinėlių rezultatus su mikobakterijų kultūrų rezultatais (6,079 mėginiai iš 2,609 pacientų). Iš jų 4,000 mėginių buvo surinkti iš 1,898 pacientų, kuriems antituberkuliozės terapija nebuvo taikoma. 6 tyrimų vietos buvo geografiškai skirtingos: 5 dideli didmiesčių ligoninių centrai su tuberkuliozės gydymo centrais ir viena viešoji laboratorija.

MTD tyrimo formatas buvo įvertintas atskirame tyrime 7 vietose lyginant MTD tyrimo rezultatus su mikobakterijų kultūrų rezultatais. 7 tyrimo vietos buvo geografiškai skirtingos; 6 vietos buvo dideli didmiesčių ligoninių centrai su tuberkuliozės gydymo centrais, iš kurių viena buvo nacionalinė mikobakteriologijos laboratorija.

Septintoji vieta buvo viešoji laboratorija. Buvo tiriami mėginiai, surinkti iš pacientų, kuriems terapija nebuvo taikoma. Iš jų 132 buvo kultūrai teigiami dėl *M. tuberculosis* komplekso. MTD aptiko 119 kultūrai teigiamus mėginius; 7 mėginiuose buvo MOTT šalia *M. tuberculosis*.

**Mėginiai iš negydytų pacientų  
MTD ir kultūros palyginimas (n=704)**

**PAGAL PACIENTUS  
(prieš išskyrimą)**

		kultūra	
		+	-
MTD	+	54	4
	-	4	221

**PAGAL PACIENTUS  
(po išskyrimo)**

		kultūra	
		+	-
MTD	+	56	2
	-	4	221

**PAGAL MĖGINIUS  
(prieš išskyrimą)**

		kultūra	
		+	-
MTD	+	119	6
	-	13	564

**PAGAL MĖGINIUS  
(po išskyrimo)**

		kultūra	
		+	-
MTD	+	125	2
	-	13	564

Į šį tyrimą buvo įtraukti pacientai, kuriems buvo įtariama aktyvi plaučių tuberkuliozė ir kuriems terapija nebuvo taikoma. Visas kultūrai teigiamų dėl *M. tuberculosis* pacientų paplitimas buvo 20.5%.

MTD tyrimo jautrumas buvo 93.3%, o specifiškumas - 99.1%, palyginus su kultūrų rezultatais. MTD tyrimo jautrumas mėginiui buvo 90.6%, o specifiškumas - 99.6%, palyginus su kultūrų rezultatais. Rezultatai, gauti iš 7 vietų dėl jautrumo, specifiškumo, teigiamos numanomos vertės (PPV) ir neigiamos numanomos vertės (NPV), yra pateikiami žemiau esančioje lentelėje su 95% pasikliauties intervalais dėl atlikimo įvertinimo. Visi duomenys yra pateikiami po prieštaringos rezoliucijos, grindžiamos kitai kultūrai teigiamų mėginių iš to paties paciento buvimu ir/ar remiantis terapeuto galutine diagnoze.



<b>Pagal pacientus</b>			
	Bendras procentas	Skaičius iš VISO	95% pasiklovimo intervalas
Jautrumas	<b>93.3%</b>	<b>56/60</b>	<b>83.8 - 98.2%</b>
Specifiškumas	<b>99.1%</b>	<b>221/223</b>	<b>96.8 - 99.9%</b>
TPV (teigiama prognostinė vertė)	<b>96.6%</b>	<b>56/58</b>	<b>88.1 - 99.6%</b>
NPV (neigiama prognostinė vertė)	<b>98.2%</b>	<b>221/225</b>	<b>95.5 - 99.5%</b>
<b>Pagal mėginius</b>			
	Bendras procentas	Skaičius iš VISO	95% pasiklovimo intervalas
Jautrumas	<b>90.6%</b>	<b>125/138</b>	<b>84.4 - 94.9%</b>
Specifiškumas	<b>99.6%</b>	<b>564/566</b>	<b>98.7 - 100%</b>
TPV (teigiama prognostinė vertė)	<b>98.4%</b>	<b>125/127</b>	<b>94.4 - 99.8%</b>
NPV (neigiama prognostinė vertė)	<b>97.7%</b>	<b>564/577</b>	<b>96.2 - 98.8%</b>

Iš 564 mėginių, kurie buvo kultūra ir MTD neigiamų dėl *M. tuberculosis* komplekso, 114 mėginių augo MOTT ant kultūros, 64 buvo iš pacientų su kitomis kultūromis, teigiamomis dėl MOTT ir 169 buvo iš pacientų su neigiamomis mikobakterijų kultūromis.

#### B. Preciziškumo tyrimas

Preciziškumo paneliai, susidedantys iš 2 neigiamų mėginių, 2 mažai teigiamų mėginių (<sup>a</sup> 100 KfV/tyrimui) ir 2 gana aukštai teigiamų mėginių (<sup>a</sup> 1000 KfV/tyrimui) buvo tiriami 3 vietose. Teigiami mėginiai buvo paruošti pridėjus dirbtinį inhibicinį sedimento pulą su žinomu kiekiu *M. tuberculosis*. Mėginiai buvo tirti trigubu pakartojimu du kartus per dieną tris dienas iš eilės trijose vietose. Kiekvienam tyrimui buvo naudojamos teigiamos ir neigiamos amplifikacijos kontrolės.

Kadangi nebuvo pastebėta jokie kintamumo tarp vietų ar dienų, visų trijų vietų duomenys buvo sujungti ir yra pateikiami žemiau. Išmatuotos RLU vertės yra ribojamos liuminometro fotomultiplikatoriaus. Todėl, vertės, didesnės nei 2,000,000 RLU yra sutrumpintos. Standartinė deviacija ar % CV vertės nėra pateikiamos.

#### Preciziškumo tyrimas

	Stebėjimų skaičius	Tikslumas %	Ribos (RLU)	Vidurkis (RLU)
Mėginys 1 Aukštas teigiamas	<b>108</b>	<b>100%</b>	<b>154,103 - &gt;2,000,000</b>	<b>&gt;2,000,000</b>
Mėginys 2 Žemas teigiamas	<b>108</b>	<b>99.1%</b>	<b>16,324 - &gt;2,000,000*</b>	<b>&gt;2,000,000</b>
Mėginys 3 Neigiamas	<b>108</b>	<b>100%</b>	<b>2,004 - 5,693</b>	<b>2,689</b>
Teigiama ląstelių kontrolė	<b>54</b>	<b>100%</b>	<b>&gt;2,000,000</b>	<b>&gt;2,000,000</b>
Neigiama ląstelių kontrolė	<b>54</b>	<b>100%</b>	<b>2,272 - 4,241</b>	<b>2,944</b>

**C. Atkartojamumas**

Atkartojamumo panelis buvo sudarytas iš 25 mėginių su amplifikacijos neigiamomis kontrolėmis, įterptomis tarp kiekvieno mėginio (iš viso 50 mėginių). Atkartojamumo panelis buvo tirtas 4 vietose. Iš viso, 100% (120/120) neigiamų mėginių atitiko tikėtinus rezultatus ir 98.8 % (79/80) teigiamų mėginių atitiko tikėtinus rezultatus.

**D. Analitinis specifiškumas**

MTD tyrimo specifiškumas buvo įvertintas naudojant bakterijas, grybelius ir virusus. Bakterijoms ir grybeliui specifiškumo tyrimas apėmė 160 padermių (151 rūšis iš 62 genčių), artimai susijusių mikobakterijų, kitų organizmų, sukeliančių kvėpavimo susirgimus ir normalią respiracinę florą ar kryžminio pasirinkimo filogenetikos organizmus. Tipinės padermės buvo gautos iš "American Type Culture Collection" (ATCC), o 5 izoliatai buvo gauti iš klinikinių laboratorijų. Lizatai, paruošti iš aktyviai augančių kultūrų (ar rRNR trijuose atvejuose) buvo įvertinti MTD tyrime pagal nurodymus, pateikiamus TYRIMO PROCEDŪROJE. Buvo iširta apytikriai  $5 \times 10^7$  CFU vienoje reakcijoje. Tik *M. tuberculosis* komplekso padermės atitiko teigiamus rezultatus, išskyrus *M. celatum* ir *M. terrae*-like.

Prie koncentracijų, didesnių nei 30 CFU tyrime, *M. celatum* ir kai kurios *M. terrae* panašios padermės atitiks teigiamus MTD tyrimo rezultatus. Prie 30 CFU tyrime, *M. celatum* atitiko 26,772 RLU, o *M. terrae* panašios padermės išsidėstė nuo 19,470 iki 49,976 RLU.

**E. Aptikimo ribos**

MTD tyrimu buvo aptikta trisdešimt (30) *M. tuberculosis* padermių iš plataus geografinio pasiskirstymo, įskaitant tipines vaistams atsparias ir vaistams jautrias padermes. MTD tyrimas aptiko 1 KFV tyrimui iš visų 30 padermių.

**F. Atstatymas**

Dvidešimt penkios (25) fg *Mycobacterium tuberculosis* rRNR (ekvivalentas 5 CFU tyrime) buvo tirti prie 540,000 KFV tyrimui (450 µL) dėl šių relevantinių organizmų: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. terrae*, *Nocardia asteroides*, *N. otitidis-caviarum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. diphtheriae*, *Gordona sputi*, ir *Rhodococcus bronchialis*. Visi tyrimo rezultatai buvo teigiami dėl *M. tuberculosis* rRNA esant šiems ne taikinio organizmams.

## KLAIDŲ APTIKIMAS

PASTEBĖJIMAS	GALIMA PRIEŽASTIS	REKOMENDUOJAMI VEIKSMAI
<p>Pakilusi amplifikacijos laštelių neigiama kontrolė ar mėginio apdorojimo neigiama kontrolė (<math>\geq 20.000</math> RLU)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nepakankamas maišymas ar nepakankamas tūris po mikobakterijų pasirinkimo reagento (S) įdėjimo.</li> <li>▪ Neapdairiai atliktos reakcijos, kurių metu buvo įneštas užterštumas.</li> </ul>	<p>Atlikite tinkamą maišymą. Įsitinkinkite, kad yra pridėtas reikiamas tūris. Vizualiai įvertinkite, ar tirpalas yra vienodai rožinis po purtymo.</p> <p>Labai atsargiai ir kruopščiai dozuokite. Panaudoti reakcijų mėgintuvėliai turi būti nukenksminti buitiniu balikliu, atskiestu santykiu 1:9, kaip aprašyta TYRIMO PROCEDŪROJE. Laboratorijos darbastaliai, sauso karščio vonelės, vandens vonelės ir dozatoriai turi būti nukenksminti buitiniu balikliu, atskiestu santykiu 1:1, kaip aprašyta TYRIMO PROCEDŪROJE.</p>
<p>Žema amplifikacijos laštelių teigiama kontrolė ar mėginio apdorojimo teigiama kontrolė (<math>&lt; 500.000</math> RLU)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Praleistas 5 minučių atvėsinimo etapas.</li> <li>▪ Laboratorijos paviršių ar reagentų užterštumas.</li> <li>▪ Prieš nuskaitymą liuminometre mėgintuvėliai nebuvo nušluostyti.</li> <li>▪ Amplifikacija buvo atlikta virš nurodytų temperatūros ribų.</li> <li>▪ Amplifikacijos reagentas buvo įlašintas ant mėgintuvėlio sienelės, o ne į dugną.</li> <li>▪ Buvo atliktas nepakankamas maišymas po tuberkuliozės mikobakterijų hibridizavimo reagento įdėjimo.</li> <li>▪ Per daug įdėta pasirinkimo reagento.</li> <li>▪ Pasirinkimo etapas užsitęsė ilgiau nei rekomenduojama.</li> <li>▪ Mėgintuvėliai buvo vėsinami prie žemesnės nei 42°C temperatūros po inkubavimo prie 95°C.</li> <li>▪ Aptikimo reagento linijos yra užterštos.</li> </ul>	<p>Mėgintuvėliai turi būti nušluostomi drėgnu audeklu ar ne medvilniniu popieriniu rankšluosčiu prie nuskaitymą liuminometre.</p> <p>Patikrinkite vandens vonelės ir/ar sauso karščio vonelės temperatūrą ir, jei reikia, nustatykite temperatūrą, nurodytą procedūroje.</p> <p>Purtykite kaip nurodyta. (žr. Hibridizaciją, 2 etapą) Vizualiai įvertinkite, ar tirpalas yra vienodai geltonas po purtymo.</p> <p>Patikrinkite dozatoriaus tūrio nustatymą.</p> <p>Stebėkite, kad pasirinkimo etape inkubacijos prie 60°C laikas būtų 15 minučių.</p> <p>Perneškite mėgintuvėlius tiesiai iš 95°C sauso karščio vonelės į 42°C vandens vonelę/sauso karščio vonelę.</p> <p>Atlikite šilto vandens užpylimus, kaip nurodyta instrumento naudojimo instrukcijoje.</p>

**PASTABOS**

- A. Kaitinimo blokai turi turėti šulinėlius, tinkamus 12 x 75 mm mėgintuvėliams. Rekomenduojame naudoti Hologic sauso karščio vones.
- B. Mikrocentrifuginiai mėgintuvėliai užsukamais kamšteliais yra rekomenduojami užšaldytų kiekių laikymui. Individualiai užšaldyti kiekiai gali būti užšaldomi ir atšildomi tik vieną kartą, nenaudokite bešerkšnių šaldytuvų.
- C. Užšaldytų kiekių laikymui yra rekomenduojami krio-buteliukai. Individualiai užšaldyti kiekiai gali būti užšaldomi ir atšildomi tik vieną kartą, nenaudokite bešerkšnių šaldytuvų.
- D. Dėl purtymo įrangos skirtumų ir greičio variacijų, gali prireikti ilgesnio purtymo laiko. Nustatykite purtyklės greitį ir laikykitės nurodymų, pateiktų PROCEDŪROS PASTABOSE, E skyriuje. Adekvatus purtymas yra būtinas norint gauti tikslius tyrimo rezultatus. Laikas, pratęstas iki 15 sekundžių, neįtakos tyrimo rezultatų.

## LITERATŪRA

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 acridinuin-ester-labeled DNA probes. Clin. Chem. **35**:1588-1594.
3. **Bradley, S.T., S.L. Reed and A. Catanzaro**, 1996. Clinical Efficacy of the Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **153**:1606-1610.
4. Centers for Disease Control, 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. Centers for Disease Control and Prevention, and National Institute of Health. May, 1993. 3rd Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. pp. 93-96.
6. **Collins, F. M.**, 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. Clin. Microbiol. Rev. **2**: 360-377.
7. **Kent, P.T. and G.P. Kubica**, 1985. *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*. U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control: Principles and definitions; Approved Guideline. NCCLS document C24-A. Villanova, PA: NCCLS; 1991.
9. **Pitchenik, A.E., D. Fertel, and A.B. Block**, 1988. *Mycobacterial Disease: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention*. Clin. Chest Med. **9**:425-441.
10. **Roberts, G.D., E.W. Koneman, and Y.K. Kim**, 1991. Mycobacterium, pp. 304-339. In A. Balows, et al. (eds.), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. **Simone, P.M. and Iseman, M.D.**, 1992. Drug-resistant Tuberculosis: A Deadly and Growing Danger. J. Resp. Dis. **13**:960-971.
12. **Wayne, L.G.**, 1982. Microbiology of the tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis. **125** (3 pt 2):31-41.
13. **Van Soolingen, D.**, et al. 1997. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Intl. J. Syst. Bacteriol. **47**:1236-1245.
14. **Kerleguer A., Koeck J. L., Fabre M., G r me P., Teyssou R., Herv  V.**, 2002. Application of a Grey-Zone for the Interpretation of The "Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test" for the Rapid Diagnosis of Respiratory Tuberculosis. Esm May 2002.
15. **Coll P., Garrig  M., Moreno C., Marti N.**, 2002. "Routine Use of E-Mtd (Gen-Probe) For Direct Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Clinical Samples." Esm 2002.



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

**Klientų aptarnavimas:** +1 800 442 9892  
customersupport@hologic.com

**Techninės pagalbos centras:** +1 888 484 4747  
molecularsupport@hologic.com

Išsamesnės kontaktinės informacijos ieškokite [www.hologic.com](http://www.hologic.com).

„Hologic“, „Amplified MTD“ ir „Leader“ yra „Hologic, Inc.“ ir (arba) jos filialų prekių ženklai ir (arba) registruotieji prekių ženklai Jungtinėse Amerikos Valstijose ir (arba) kitose šalyse.

Visi kiti šiame lapelyje naudojami prekių ženklai yra atitinkamų savininkų nuosavybė.

Šiam produktui gali būti taikomas vienas ar keli JAV patentai, nurodyti adresu [www.hologic.com/patents](http://www.hologic.com/patents).



**Hologic N.V.**

Da Vincilaan 5  
1930 Zaventem  
Belgium

©1995–2018 Hologic, Inc. Visos teisės saugomos.  
AW-12601-3001 Rev. 003 (LT)  
2018-03