

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)**
(bioMérieux ref. 39002 / Hologic Cat. No. 102835)

MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST (ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)

ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΟ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ
(bioMérieux ref. 39002 / Hologic Cat. No. 102835)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι μια ταχεία εξέταση με ανιχνευτή DNA (DNA probe) η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική υβριδισμού νουκλεϊνικού οξέως για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium avium* που απομονώνεται από καλλιέργεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Το *Mycobacterium avium* (*M. avium*) είναι μέλος του *Mycobacterium avium* complex (*M. avium* complex) που αποτελείται από ορισμένους οργανισμούς των οποίων οι ταξινομικές σχέσεις είναι ασαφείς και αμφισβητήσιμες, αλλά η παθογένειά τους στον άνθρωπο είναι αδιαφιλονίκητη (16). Το *M. avium* έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί σημαντική νόσο σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (12). Η θεραπεία αυτής της λοίμωξης είναι δύσκολη και η σοβαρότητα της λοίμωξης απαιτεί ταχεία διάγνωση. Επιπλέον, σε ορισμένα εργαστήρια ο επιπολασμός του *M. avium* complex είναι ίσος με ή μεγαλύτερος από τον επιπολασμό του *M. tuberculosis*.

Οι κλασσικές μέθοδοι ταυτοποίησης των μυκοβακτηρίων στηρίζονται στη χρώση δειγμάτων για οξεάντοχους βάκιλους και κατόπιν στην καλλιέργεια και τη βιοχημική εξέταση. Μπορεί να χρειαστούν μέχρι και δύο μήνες για να κατηγοριοποιηθεί σε είδος ένα απομονωμένο στέλεχος *Mycobacterium* χρησιμοποιώντας αυτές τις τυπικές τεχνικές καλλιέργειας (8).

Το *M. avium* complex πιστεύεται γενικά ότι αποτελείται από δύο είδη: το *M. avium* και το *M. intracellulare*. Φαινοτυπικά το *M. avium* και *M. intracellulare* είναι ουσιαστικά δυσδιάκριτα και οι βιοχημικές εξετάσεις δεν είναι ικανές να κάνουν διάκριση μεταξύ τους.

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) υπήρξε χρήσιμη στην ταυτοποίηση του *M. avium* και *M. intracellulare* (3), είναι, όμως, χρονοβόρα και δεν είναι διαθέσιμη στα περισσότερα εργαστήρια.

Οι ορολογικές τεχνικές χρησιμοποιούνται επίσης για τη διαφοροποίηση των στελεχών *M. avium* και *M. intracellulare*, με χρήση ορών α-αντιγόνου και μπορεί να είναι χρήσιμη σε επιδημιολογικές μελέτες. Όμως, ο προσδιορισμός ορρότυπου δεν είναι γενικά διαθέσιμος και η χρήση του στην διαχείριση ασθενών είναι περιορισμένη. Επί του παρόντος, υπάρχουν 28 οροποικιλίες που είναι γενικά αποδεκτές στο *M. avium* complex και σε διαφορετικές χρονικές στιγμές έχουν προσδιορισθεί διάφοροι ορρότυποι στα μεμονωμένα είδη *M. avium* και *M. intracellulare*. Ιστορικά, οι οροποικιλίες 1 έως 3 θεωρούνταν *M. avium*, ενώ οι οροποικιλίες 4 έως 28 θεωρούνταν *M. intracellulare* (15).

Σε αρκετές μελέτες, ο Baess χρησιμοποίησε υβριδισμό DNA:DNA για να αποσαφηνίσει τις ταξινομικές σχέσεις μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Βάσει των αναλύσεών του, συμπέρανε ότι οι οροποικιλίες 4, 5, 6, και 8, οι οποίες σε εκείνη τη χρονική περίοδο ήταν ταξινομημένες ως *M. intracellulare*, ανήκαν στην πραγματικότητα στο είδος *M. avium*. Η κατάσταση της οροποικιλίας ήταν ασαφής (1, 2).

Οι Saito, *et al*, χρησιμοποίησαν επίσης τεχνολογία DNA ανιχνευτή και πρότειναν την εκ νέου ανάθεση των 28 οροποικιλιών ως εξής: οροποικιλίες 1 έως 6, 8 έως 11, και 21 στο *M. avium*; οροποικιλίες 7, 12 έως 20, και 25 στο *M. intracellulare*, οι οροποικιλίες 22 έως 28 (εκτός της οροποικιλίας 25) θεωρούνταν ετερογενείς και δεν μπορούσαν να αποδοθούν σε κανένα από τα δύο είδη (13). Επιπλέον, ο ορρότυπος ορισμένων στελεχών δεν μπορούσε να προσδιοριστεί και κάποια συγκολληθήκαν σε περισσότερους από έναν αντιπό.

Άλλες αναφορές που χρησιμοποίησαν ανιχνευτές DNA για τον προσδιορισμό των ειδών του *Mycobacterium avium* complex έχουν δημοσιευθεί επίσης, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης DNA ανιχνευτών για επιδημιολογικές μελέτες και τη γεωγραφική κατανομή των *M. avium* και *M. intracellulare* (5-7, 9, 11, 14).

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ταυτοποιεί το *M. avium* που απομονώνεται από καλλιέργεια σε λιγότερο από μια ώρα. Η ταυτοποίηση βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών του ριβοσωμικού RNA που είναι μοναδικές για το *M. avium*. Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ προσφέρει ταχεία, μη υποκειμενική και ακριβή ταυτοποίηση *M. avium* που απομονώνεται από καλλιέργεια.

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 (10). 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 MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ διατίθενται σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM PROBE KIT (ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ MYCOBACTERIUM AVIUM)

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

Σωληνάρια Λύσης (Lysing Tubes) (LT) (1 x 20 σωληνάρια)
Γυάλινα σφαιρίδια και ρυθμιστικό διάλυμα.

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) 0,1% υπεροξειδίου υδρογόνου σε 0,001 N νιτρικό οξύ.	1 x 240 mL
Αντιδραστήριο Ανίχνευσης II (Detection Reagent) (RII) 1 N υδροξειδίου του νατρίου.	1 x 240 mL

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- A. Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- B. Χρησιμοποιείτε τις παγκόσμιες προφυλάξεις ασφαλείας όταν εκτελείτε αυτή την ανάλυση (4).
- Γ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά για την ταυτοποίηση του *M. avium* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.
- Δ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά τα παρεχόμενα ή ειδικά 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 Ασφάλειας 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.
- Z. Αποφεύγετε την επαφή των Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης (Detection Reagent) I και II με το δέρμα, τα μάτια, και το βλεννογόνο. 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 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 MYCOBACTERIUM AVIUM 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 MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium avium* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

A. **Μέθοδος Στερεών Υλικών.** Μπορεί να εξεταστεί η ανάπτυξη από κατάλληλα στερεά υλικά, όπως Lowenstein-Jensen υπό κλίση ή τρυβλία Middlebrook 7H10 ή 7H11, που υποδηλώνουν *M. avium*. Τα δείγματα μπορούν να εξεταστούν μόλις είναι ορατή η ανάπτυξη 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 στελέχους.

B. Μέθοδος Καλλιέργειας Ζυμού. Με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορεί να εξεταστεί ανάπτυξη σε ζυμό Middlebrook 7H9 με θολερότητα ισοδύναμη με ή μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την Πρότυπη Θολοσιμετρική κλίμακα McFarland 1. Εισάγετε ένα δείγμα 100 µL από το καλά αναμειγμένο εναιώρημα ζυμού στο Σωληνάριο Λύσης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
(bioMérieux ref. 39002 / Hologic Cat. No. 102835)

Αντιδραστήριο Ανιχνευτή (Probe Reagent) (P)
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* (60° ± 1°C)

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

Μικροδιανεμητές (Microripettes) (100 µL, 300 µL)

Σύστημα επαναληπτικής αναρρόφησης (Re-ripettor) (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 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 HOLOGIC ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)
(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 ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

A. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

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

α. Προσθέστε αρκετό ζεστό νερό για να γεμίσετε τη συσκευή υπερήχων μέχρι 1 εκατοστό 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 $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και μια άλλη θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

3. Ετοιμάστε τον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic Leader 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. Μια καλλιέργεια *M. avium* (π.χ., American Type Culture Collection, ATCC #25291) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός έλεγχος ενώ η καλλιέργεια *M. intracellulare* (π.χ., ATCC #13950) 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 εξετάζεται 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, σε μια θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο για 10 λεπτά στους $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

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

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

4. Καλύψτε ξανά τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή και επώαστε για 15 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 αναμειχθούν εντελώς.
2. Επωάστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή για 5 λεπτά στους $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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.**

Z. 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° έως 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 5 λεπτά τουλάχιστον αλλά όχι περισσότερο από 6 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 του δακτυλίου σφράγισης. Θα πρέπει επίσης να διασφαλίζεται ότι είναι βυθισμένο το σύνολο του όγκου του υγρού αντίδρασης στα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή.

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

ΣΤ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ:

1. Οι αυξημένες αρνητικές τιμές ελέγχου (*M. intracellulare* ATCC #13950) 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 αριθμό κυττάρων, ακατάλληλη κατεργασία με υπερήχους ή από την εξέταση ανάμικτων ή παλαιών καλλιέργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμικτες καλλιέργειες, 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 (*M. Avium*, ATCC #25291) κάτω των 30,000 RLU στο Leader ή 900 PLU στο AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή αριθμό κυττάρων, ακατάλληλη 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 επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM 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	Leader
	(πρώην PAL)	
Τιμή Cut-off	900 PLU	30.000 RLU
Εύρος επανάληψης	600-899 PLU	20,000-29,999 RLU

B. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αρνητικός έλεγχος (π.χ., *M. intracellulare*, ATCC #13950) και ο θετικός έλεγχος (π.χ., *M. avium*, ATCC #25291) θα πρέπει να ικανοποιούν τις ακόλουθες τιμές:

	AccuLDR	Leader
	(πρώην PAL)	
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 ζυμού 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).

Τα αποτελέσματα από την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM 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 AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με τυπικές μεθόδους βιοχημικής ταυτοποίησης καλλιέργειας σε τρεις τόπους, Τόπος 1, 2, και 3, χρησιμοποιώντας 120 απομονωμένα στελέχη του *Mycobacterium avium* και 220 απομονωμένα στελέχη από 25 άλλα είδη *Mycobacterium*. Αέρια και υγρή Χρωματογραφία (GLC) χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση στον Τόπο 1 εκτός από την τυπική ταυτοποίηση από καλλιέργεια. Η τυπική ταυτοποίηση από καλλιέργεια εξαρτάται από το ρυθμό ανάπτυξης, τη μορφολογία των αποικιών, τη μικροσκοπική εξέταση και μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων. Επιπλέον, η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) στον τόπο 4 χρησιμοποιώντας συνολικά 97 στελέχη *Mycobacterium*. Η HPLC ταυτοποίησε 30 απομονωμένα στελέχη ως *Mycobacterium avium*,

31 απομονωμένα στελέχη ως *Mycobacterium intracellulare*, και 36 απομονωμένα στελέχη από 12 άλλα είδη *Mycobacterium*. Χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ όλες οι απομονώσεις κατηγοριοποιήθηκαν ως θετικές (> 30,000 RLU) ή αρνητικές (< 30,000 RLU). Το εύρος των παρατηρήσεων για αρνητικές καλλιέργειες ήταν 206 έως 11,434 RLU και 52,151 έως 739,861 RLU για θετικές καλλιέργειες. Μια

σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τις τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης από καλλιέργεια GLC (Τόπος 1) και HPLC (Τόπος 4) παρουσιάζεται παρακάτω.

ACCUPROBE / ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, GLC ΚΑΙ HPLC

	Θετ. Θετ.	Θετ. Αρν.	Αρν. Θετ.	Αρν. Αρν.	Ευαισθησία/ Ειδικότητα	Ποσοστό Συμφωνίας
Τόπος 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Τόπος 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Τόπος 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Τόπος 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Σύνολο	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Ένα AccuProbe αρνητικό, HPLC θετικό απομονωμένο στέλεχος *M. avium* ήταν έντονα θετικό μετά από επανεξέταση με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

A. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Η ακρίβεια εντός της σειράς της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ υπολογίστηκε αναλύοντας δύο συγκεντρώσεις ριβοσωμικού RNA που απομονώθηκε από *M. avium* χρησιμοποιώντας 10 αντίγραφα σε μια μόνο ανάλυση.

Mycobacterium avium

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	10	10
Μέση Απόκριση	25,738	47,730
Τυπική Απόκλιση	445	668
Συντελεστής Διακύμανσης	1,7%	1,4%

B. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

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

Mycobacterium avium

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	12	12
Μέση Απόκριση	27,929	50,418
Τυπική Απόκλιση	1,465	2,833
Συντελεστής Διακύμανσης	5,2%	5,6%

Γ. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αξιολογήθηκαν συνολικά 114 ATCC απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσώπευαν συνολικά 92 είδη από 41 γένη. Δεκαέξι απομονωμένα στελέχη *M. avium*, 49 απομονωμένα στελέχη 28 άλλων ειδών *Mycobacterium* και 65 απομονωμένα στελέχη από 40 άλλα γένη που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Μόνο τα

απομονωμένα στελέχη *M. avium* που εξετάστηκαν παράγγααν θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Άλλα είδη *Mycobacterium* και αντιπροσωπευτικά φυλογενετικά διασταυρούμενα είδη δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας αυτή τη συσκευασία.

Δ. ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Αναλύθηκε το ριβοσωμικό RNA του *Mycobacterium avium* σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5×10^{-4} mg και 1×10^{-1} mg ανά εξέταση παρουσία 30 εκατομμυρίων κυττάρων είτε *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* ή *Nocardia asteroides*. Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή του σήματος για *M. avium* και οι άλλοι οργανισμοί που ήταν παρόντες δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM AVIUM ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Baess, I.** 1983. Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *M. avium*, *M. avium* and *M. scrofulaceum*. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. **91**:201-203.
2. **Baess, I.** 1979. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. **87**:221-226.
3. **Butler, W. R., and J. O. Kilburn.** 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *M. gordonae* by high performance liquid chromatography of their mycolic acids. J. Clin. Microbiol. **26**:50-53.
4. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. **Drake, T. A., J.A. Hindler, G. W. Berlin, and D. A. Bruckner.** 1987. Rapid identification of *M. avium* complex in culture using DNA probes. J. Clin. Microbiol. **25**:1442-1445.
6. **Ellner, P. D., T. E. Kiehn, R. Cammarata, and M. Hosmer.** 1988. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J. Clin. Microbiol. **26**:1349-1352.
7. **Gonzalez, R. and B.A. Hanna.** 1987. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **8**:69-77
8. **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.
9. **Kiehn, T. E. and F. F. Edwards.** 1987. Rapid identification using a specific DNA probe of *M. avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. **25**:1551-1552.
10. **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.
11. **Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts.** 1988. Identification of Mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *M. avium* complex and *M. tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. **26**:2120-2123.
12. **Pitchenik, A. E., D. Fertel, and A. B. Block.** 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. Clin. Chest. Med. **9**:425-441.
13. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, and D. Dawson.** 1990. Identification of various serovar strains of *M. avium* and *M. intracellulare*. J. Clin. Microbiol. **28**:1694-1697.
14. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, M. Tsukamura, F. Kuze and K. Asano.** 1989. Identification and partial characterization of *M. avium* and *M. intracellulare* by using DNA probes. J. Clin. Microbiol. **27**:994-997.
15. **Schaefer, W. B.** 1965. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Respir. Dis. **92**(Suppl.): 85-93.
16. **Sommers, H. M. and R. C. Good.** 1985. M., p. 216-248. In E. H. Lennette, *et al.* (ed.) Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



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



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

102899F-01-EL Rev. 002 2017-05
©1990 - 2017 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.