

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΥCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)**
(bioMérieux ref. 39004 / Hologic Cat. No. 102840)

MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE CULTURE IDENTIFICATION TEST
(ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ)
ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΓΙΑ ΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΟ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ
(bioMérieux ref. 39004 / Hologic Cat. No. 102840)

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Το *Mycobacterium intracellulare* (*M. intracellulare*) 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. intracellulare* έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί σημαντική νόσο σε ανοσοκατασταλαμένους 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 ή μεγαλύτερος από τον επιπολασμό του *M. tuberculosis*.

Οι κλασικές μέθοδοι ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων στηρίζονται στη χρώση δειγμάτων για οξείαντοχους βάκιλλους και κατόπιν την καλλιέργεια και βιοχημική εξέταση. Μπορεί να χρειαστεί μέχρι και δύο μήνες για να κατηγοριοποιηθεί σε είδος ένα απομονωμένο στέλεχος *Mycobacterium* χρησιμοποιώντας αυτές τις τυπικές μεθόδους καλλιέργειας (8).

Το *M. avium* complex πιστεύεται 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 τους διαφοροποιήσουν.

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. intracellulare* και *M. avium*, χρησιμοποιώντας ορούς α-αντιγόνου και μπορεί να είναι χρήσιμοι σε επιδημιολογικές μελέτες. Όμως, ο προσδιορισμός ορότυπου 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 ανατεθεί διάφοροι ορότυποι 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, η Baess χρησιμοποίησε υβριδισμό DNA:DNA για να αποσαφηνίσει τις ταξινομικές σχέσεις μεταξύ των δύο αυτών ειδών. Βάσει των αναλύσεων της, συμπεράνε 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 ανιχνευτή DNA 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) θεωρήθηκαν ετερογενείς και δεν μπορούσαν να ανατεθούν σε κανένα από τα δύο είδη (13). Επιπλέον, ο ορότυπος ορισμένων στελεχών δεν μπορούσε να προσδιοριστεί και σε κάποια παρατηρήθηκε συγκόλληση σε περισσότερους από έναν αντιορό.

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

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ταυτοποιεί το *M. intracellulare* που απομονώνεται από καλλιέργεια σε λιγότερο από μια ώρα από την προετοιμασία του δείγματος. Η ταυτοποίηση βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών ριβοσωμικού RNA που είναι μοναδικές για το *M. intracellulare*. Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ προσφέρει ταχύ, μη υποκειμενικό και ακριβή τρόπο ταυτοποίησης *M. intracellulare* που έχει απομονωθεί 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 μονόκλινο 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 που είναι 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 INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ διατίθενται σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες:

**ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE PROBE KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE)**

Αντιδραστήριο Ανιχνευτής (Probe Reagent) (P) (4 x 5 σωληνάρια)
Mycobacterium intracellulare

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

**ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT
(ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ACCUPROBE ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ 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 Reagent) (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 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ HOLOGIC)**

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 υπεροξειδίου του νατρίου

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 *M.intracellulare* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.
- Δ. Χρησιμοποιείτε αποκλειστικά τα παρεχόμενα ή ειδικά εργαστηριακά είδη.
- E. Ο χειρισμός των καλλιιεργειών και όλων των διαδικαστικών σταδίων μέχρι το στάδιο αδρανοποίησης δια της θερμότητας θα πρέπει να εκτελούνται σε Θάλαμο Βιολογικής Ασφάλειας Τάξης 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 τους βλεννογόνους. Σε περίπτωση επαφής αυτών των αντιδραστηρίων με το δέρμα, 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 INTRACELLULARE 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 INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ είναι σχεδιασμένη για την ταυτοποίηση του *Mycobacterium intracellulare* που έχει απομονωθεί από καλλιέργεια.

A. **Μέθοδος Στερεών Υλικών.** Μπορεί να εξεταστεί η ανάπτυξη από κατάλληλα στερεά υλικά, όπως κεκλιμένα Lowenstein-Jensen ή τρυβλία Middlebrook 7H10 ή 7H11, με πιθανή ύπαρξη *M. intracellulare*. 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 πλαστικό κρίκο μιας χρήσης, συμμάτινο κρίκο ή πλαστική βελόνα μιας χρήσης 1 mL. Δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στυλεοί λόγω της μικρής ποσότητας υγρού στο οποίο κατόπιν επαναιωρούνται τα κύτταρα.

2. Αποφεύγετε να λαμβάνετε μέρος του στερεού υλικού με τα κύτταρα.

3. Ο χειριστής μπορεί να επιλέξει να επωάσει ένα άλλο τρυβλίο καλλιέργειας σε αυτή τη χρονική στιγμή για να επιβεβαιώσει την καθαρότητα των απομονωμένων στελεχών.

B. **Μέθοδος Καλλιέργειας Ζωμού.** Με την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ μπορεί να εξεταστεί ανάπτυξη σε ζωμό Middlebrook 7H9 με θολερότητα ισοδύναμη ή μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την Πρότυπη Θολοσιμετρική κλίμακα McFarland 1. Εισάγετε ένα δείγμα

100 µL από το καλά αναμειγμένο εναιώρημα ζυμού στο Σωληνάριο Αντιδραστήριου Λύσης, όπως περιγράφεται παρακάτω.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
(bioMérieux ref. 39004 / Hologic Cat. No. 102840)

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

20 Εξετάσεις
4 x 5 σωληνάρια
1 x 20 σωληνάρια

ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΜΗ ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

1 µL στέραιο 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 (Micropipettes) (100 µL, 300 µL)

Επαναλαμβανόμενος διανεμητής (Re-pipettor) (100 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)

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

ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ HOLOGIC
(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 (Συσκευή Υπερήχων)
(bioMérieux ref. 39409 / Hologic Cat. No. 901104)

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 εξεραωθεί προσεκτικά σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:
 - α. Προσθέστε αρκετό ζεστό νερό για να γεμίσετε τη συσκευή υπερήχων μέχρι 1 cm από το επάνω μέρος της δεξαμενής νερού.
 - β. Λειτουργήστε τη συσκευή υπερήχων για 15 λεπτά ώστε να εξεραωθεί καλά το νερό.
2. Ρυθμίστε μια θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 60° ± 1°C και μια άλλη θερμαντική πλάκα ή υδατόλουτρο στους 95° ± 5°C.
3. Προετοιμάστε τον αναλυτή χημειοφωταύγειας Hologic για λειτουργία. Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα Αντιδραστηρίων Ανίχνευσης I και II για την ολοκλήρωση των εξετάσεων.

B. ΕΛΕΓΧΟΙ

1. Θετικά και αρνητικά στελέχη ελέγχου θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά σε κάθε εργαστήριο σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς. Μια καλλιέργεια *M. intracellulare* (π.χ., American Type Culture Collection, ATCC #13950) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός έλεγχος ενώ η καλλιέργεια *M. avium* (π.χ., ATCC #25291) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός έλεγχος.

Γ. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. Επισημάνετε επαρκή αριθμό Σωληναρίων Αντιδραστήριου Λύσης για να εξετάσετε τα απομονωμένα στελέχη καλλιέργειας ή/και τους ελέγχους. Αφαιρέστε και κρατήστε τα πώματα.
2. Εισάγετε 100 µL του Αντιδραστήριου 1 (Αντιδραστήριο Λύσης) και 100 µL του Αντιδραστήριου 2 (Ρυθμιστικό διάλυμα Υβριδισμού) σε όλα τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης. **Εάν πρόκειται να εξεταστούν καλλιέργειες ζυμού, μην προσθέτετε Αντιδραστήριο 1 στα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης.**
3. Μεταφέρετε το δείγμα από στερεό υλικό ή 100 µL μιας καλά αναμειγμένης καλλιέργειας ζυμού στα επισημασμένα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Περιστρέψτε τον κρίκο ή τη βελόνα στο μείγμα Αντιδραστήριου 1 και Αντιδραστήριου 2 για να αφαιρέσετε τα κύτταρα, εάν εξετάζεται ανάπτυξη σε στερεά υλικά.

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

Δ. ΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

1. Πιέστε τα Σωληνάρια Αντιδραστήριου Λύσης μέσα στο στατώ της συσκευής υπερήχων Sonicator έτσι ώστε το μείγμα αντίδρασης που βρίσκεται στο 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 Αντιδραστήριου 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 Αντιδραστήριου 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 ασφαλιζοντάς το με αυτοκόλλητη ταινία ή κλιπ. **Αφήστε τον αφυγραντή μέσα στο 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 Αντιδραστήριου 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 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 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.**

Ζ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

1. Επιλέξτε το κατάλληλο πρωτόκολλο από το μενού του λογισμικού του αναλυτή χημειοφωταύγειας.
2. Χρησιμοποιώντας ένα υγρό λεπτό χαρτί ή απορροφητικό χαρτί, σκουπίστε κάθε σωληνάριο ώστε να διασφαλίσετε ότι δεν υπάρχουν υπολείμματα στο εξωτερικό μέρος του σωληναρίου, και εισάγετε το σωληνάριο στον αναλυτή χημειοφωταύγειας σύμφωνα με τις οδηγίες του οργάνου.
3. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, αφαιρέστε το(τα) σωληνάρια(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 τα ιζήματα.

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. Επώαστε τα Σωληνάρια με Αντιδραστήριο Ανιχνευτή κατά το στάδιο 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 Αντιδραστήριου 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 σημαντικό να υπάρχει ομοιογενές μείγμα κατά τη διάρκεια των σταδίων ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ και ΕΠΙΛΟΓΗΣ, ειδικά μετά την προσθήκη των κυττάρων στα Αντιδραστήρια 1 και 2 και μετά την προσθήκη του Αντιδραστήριου 3.

ΣΤ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ:

1. Οι αυξημένες αρνητικές τιμές ελέγχου (*M. avium* ATCC #25291) άνω των 10.000 RLU (Σχετικές Μονάδες Φωτός) στο Leader ή 300 PLU (Φωτομετρικές Μονάδες Φωτός) στο AccuLDR (πρώην PAL) μπορεί να προκύψουν από ανεπαρκή αριθμό κυττάρων, ακατάλληλη κατεργασία με υπερήχους ή από την εξέταση ανάμεικτων ή παλαιών καλλιεργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμεικτες 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. Intracellulare*, ATCC #13950) 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 ανάμεικτων ή παλαιών καλλιέργειών. Επειδή μπορεί να προκύψουν ανάμεικτες καλλιέργειες, ένα μέρος της ανάπτυξης μπορεί να εμβολιαστεί σε κατάλληλο υλικό άγαρ και να επωαστεί ώστε να ελεγχθεί για πολλαπλά είδη αποικιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα της ΕΞΕΤΑΣΗΣ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE 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	900 PLU	30.000 RLU
Εύρος επανάληψης	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

Β. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΔΟΧΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

	AccuLDR (πρώην PAL)	Leader
Αρνητικός έλεγχος	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Θετικός έλεγχος	> 900 PLU	> 30.000 RLU

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μέθοδος αυτή έχει εξεταστεί χρησιμοποιώντας πρόσφατη ανάπτυξη από στερεά υλικά και καλλιέργειες 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 INTRACELLULARE 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 INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με τυπικές μεθόδους βιοχημικής ταυτοποίησης καλλιέργειας από δύο τόπους, 1 και 2, χρησιμοποιώντας συνολικά 259 απομονωμένα στελέχη: 109 απομονωμένα στελέχη *M. intracellulare* και 147 απομονωμένα στελέχη 19 άλλων ειδών *Mycobacterium*. Η τυπική ταυτοποίηση καλλιέργειας εξαρτάται από το ρυθμό ανάπτυξης, τη μορφολογία των αποικιών, τη μικροσκοπική εξέταση και μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων. Επιπλέον, η ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ συγκρίθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) στον τόπο 3 χρησιμοποιώντας συνολικά 97 στελέχη *Mycobacterium*. Η HPLC ταυτοποίησε 31 απομονωμένα στελέχη ως *M. intracellulare*, 36 απομονωμένα στελέχη ως *M. avium*, και 36 ως απομονωμένα στελέχη που αντιπροσωπεύουν 12 άλλα είδη *Mycobacterium*. Χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ όλα τα απομονωμένα στελέχη κατηγοριοποιήθηκαν ως θετικά (> 30.000 RLU) ή αρνητικά (< 30.000 RLU). Το εύρος των παρατηρήσεων για αρνητικές καλλιέργειες ήταν 266 έως 3.405 RLU και 33.851 έως 559.708 RLU για θετικές καλλιέργειες. Μια σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων με τυπικές μεθόδους ταυτοποίησης καλλιέργειας (Τόποι 1 και 2) και μεθόδων HPLC (Τόπος 3) παρουσιάζεται παρακάτω.

ACCUPROBE / ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ HPLC

AccuProbe Καλλιέργεια	Θετ. Θετ.	Θετ. Αρν.	Αρν. Θετ.	Αρν. Αρν.	Ευαισθησία/ Ειδικότητα	Ποσοστό Συμφωνίας
Τόπος 1	28	0	0	50	100% / 100%	100%
Τόπος 2	81	0	0	100	100% / 100%	100%
Τόπος 3	31	0	0	66	100% / 100%	100%
Σύνολο	140	0	0	216	100% / 100%	100%

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Α. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

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

Mycobacterium intracellulare

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	10	10
Μέση Απόκριση	39.179	71.587
Τυπική Απόκλιση	764	2.123
Συντελεστής Διακύμανσης	2,0%	3,0%

B. ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

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

Mycobacterium intracellulare

Δείγμα	A	B
Αριθμός Αντιγράφων	12	12
Μέση Απόκριση	37.541	72.189
Τυπική Απόκλιση	3.318	4.352
Συντελεστής Διακύμανσης	8,8%	6,0%

Γ. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αξιολογήθηκαν συνολικά 106 ATCC απομονωμένα στελέχη από καλλιέργεια χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Αυτά τα απομονωμένα στελέχη αντιπροσώπευαν συνολικά 91 είδη από 39 γένη. Πέντε απομονωμένα στελέχη *M. intracellulare*, 37 απομονωμένα στελέχη 25 άλλων ειδών *Mycobacterium* και 64 απομονωμένα στελέχη από 38 άλλα γένη που αποτελούσαν αντιπροσωπευτικούς φυλογενετικά διασταυρούμενους οργανισμούς αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Μόνο τα απομονωμένα στελέχη *M. intracellulare* που εξετάστηκαν παρήγαγαν ένα θετικό αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ. Άλλα είδη *Mycobacterium* και τα αντιπροσωπευτικά φυλογενετικά διασταυρούμενα είδη δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας αυτή τη συσκευασία.

Δ. ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Το ριβοσωμικό RNA *M. intracellulare* σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5×10^{-4} μg και 1×10^{-1} μg ανά εξέταση αναλύθηκε παρουσία 15 εκατομμυρίων κυττάρων *M. tuberculosis*, *M. simiae* ή *Nocardia asteroides*. Δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή του σήματος για *M. intracellulare* και οι άλλοι οργανισμοί που ήταν παρόντες δεν αντέδρασαν χρησιμοποιώντας την ΕΞΕΤΑΣΗ ACCUPROBE ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ΑΠΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.



EC REP
Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

102901F-01-GREEK Rev. 002 2017-05
©1990 - 2017 Hologic, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.