

AMPLIFIED MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DIRECT TEST

Pro diagnostické použití *in vitro* (Kit na 50 testů)
(bioMérieux ref. 39006 / Hologic kat. č. 301001)

URČENÉ POUŽITÍ

Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test firmy Hologic je test pomocí sondy nukleové kyseliny s amplifikací cílové sekvence pro *in vitro* diagnostickou detekci rRNA komplexu *Mycobacterium tuberculosis* v sedimentech připravených ze sputa (indukovaného nebo vykašlávaného), bronchiálních vzorků (např. bronchoalveolárních výplachů nebo bronchiálních aspirátů) nebo tracheálních aspirátů.

VAROVÁNÍ

Účinnost tohoto testu nebyla prokázána při přímé detekci rRNA *M. tuberculosis* z jiných klinických vzorků (např. krve, moči nebo stolice). Charakteristiky testu MTD nebyly stanoveny pro sedimenty zpracované jiným než popsaným způsobem nebo uchovávané po různá časová období nebo při jiných teplotách, než jsou uvedeny v tomto příbalovém letáku.

Pozitivní sedimenty se musí kultivovat pokud se má určit, zda vedle komplexu *M. tuberculosis* je přítomen i komplex jiných *mykobakterií* než tuberkulózních (*Mycobacteria other than tuberculosis*- MOTT), a k provedení citlivosti na antimykobakteriální látky. Kultivace na acido rezistentní bacily se také musí provést, pokud se má stanovit, který podtyp komplexu *M. tuberculosis* (např. *M. bovis*) je přítomen.

Ačkoliv při klinických hodnoceních byly testovány vzorky od pediatrických pacientů, HIV pozitivních pacientů a pacientů s infekcí MOTT, celkové počty nebyly dostačující k vyvození definitivního závěru, že u těchto specifických populací pacientů nebyly žádné významné rozdíly v charakteristikách stanovení.

Test MTD nebyl použit u vzorků od pacientů léčených antituberkulotiky k určení bakteriologického vyléčení nebo k monitorování odpovědi na takovou léčbu.

Vzorky s krví se pomocí testu MTD nesmějí zkoušet.

UPOZORNĚNÍ

- A. Pro diagnostické použití *in vitro*.
- B. Test MTD je specifický pro členy komplexu *M. tuberculosis*, ale není způsobilý mezi nimi, tj. mezi *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* a *M. canetti* (13), rozlišovat. *M. celatum* a organismy podobné *M. terrae* budou zkříženě reagovat pokud jsou přítomny v koncentraci vyšší než 30 CFU (colony forming units -CFU) na test. *M. celatum* a organismy podobné *M. terrae* jsou však vzácnými klinickými izoláty.
- C. Negativní test nevylučuje možnost izolace organismu komplexu *M. tuberculosis* ze vzorku. Výsledek testu může být ovlivněn odběrem vzorku a jeho transportem, variabilitou odběru vzorku, chybami laboratorních postupů, chybnými identifikacemi vzorku a chybami transkripce.
- D. Používejte pouze k detekci členů komplexu *M. tuberculosis* ze sedimentů připravených podle postupů NALC-NaOH nebo NaOH, které doporučily Centers for Disease Control (CDC)⁷. Tento test lze použít pouze na koncentrovaných sedimentech připravených ze sputa (indukovaného nebo vykašlávaného), tracheálních aspirátů nebo bronchiálních vzorků (např. bronchoalveolárních výplachů nebo bronchiálních aspirátů). Při resuspendování sedimentu ve fosfátovém pufru se musí postupovat pečlivě, aby se zajistilo, že koncentrace fosfátu bude 67 mM⁷.
- E. Zamezte kontaktu detekčních činidel I a II s kůží, očima a sliznicemi. Pokud ke kontaktu dojde, opláchněte postižené místo vodou. Pokud dojde k rozlití těchto činidel, nařeďte je před utřením do sucha vodou.
- F. Při provádění tohoto testu dodržujte obvyklá opatření⁴. Příprava natrávených a dekontaminovaných sedimentů a postupy MTD se musí provádět s ohledem na postupy biologické úrovně bezpečnosti 2 (Biosafety Level 2)⁵.
- G. Používejte pouze dodávané nebo doporučené jednorázové laboratorní vybavení.
- H. Pracovní povrchy, pipetovací zařízení a vybavení se musí dekontaminovat od ampliconů RNA pomocí domácího bělidla v ředění 1:1 (1 díl bělidla a 1 díl vody) podle popisu v oddílu POSTUP TESTU. Pracovní povrch se smí k odstranění bělidla setřít vodou po 15 minutách.
- I. Při provádění tohoto testu se musejí používat „positive displacement“ nebo „air displacement“ dávkovací pipety s hydrofóbně uzavřenými špičkami. Při přenášení lyzátu z lyzovací zkumavky do amplifikační zkumavky se musí použít prodloužené hydrofóbně uzavřené špičky. Na každou reakční zkumavku se musí použít zvláštní jednorázová špička. Je nutno zamezit tomu, aby se nad stojánkem se zkumavkami manipulovalo s pipetovací špičkou obsahující vzorek. Použité pipetovací špičky se musí ihned zlikvidovat do příhodné nádoby na biologicky nebezpečný odpad.

- J. Po přidání lyzátu do zkumavky dávkovací pipetou zamezte dotyku zkumavky s pipetovací špičkou, aby se minimalizovala možnost přenosu z jedné zkumavky do druhé. Proud čínidla musí směřovat proti vnitřní stěně zkumavky, aby se zabránilo rozstříknutí obsahu. Pro omezení kontaminace přenosem je důležité pečlivé pipetování.
- K. Při krocích, které předcházejí amplifikaci a v krocích po amplifikaci se musí používat oddělená pipetovací zařízení.
- L. Po odečtení reakčních zkumavek v luminometru, zkumavky dekontaminujte a pečlivě je zlikvidujte podle popisu v oddílech POSTUP TESTU a POZNÁMKY K POSTUPU, aby se zamezilo kontaminaci laboratorního prostředí amplikony.
- M. Uzavírací karty nebo patentní uzávěry se musí ihned po sejmutí z reakčních zkumavek zlikvidovat do příhodné nádoby na biologicky nebezpečný materiál. K zamezení zkřížené kontaminace se vždy musejí používat čerstvé karty nebo patentní uzávěry. Tyto materiály se NIKDY nesmějí použít opakovaně poté, co byly použity v předchozím kroku. Uzavírací karty se musí na vršky všech reakčních zkumavek pevně připevnit.
- N. Vodní lázeň během inkubace nezakrývejte, zvláště při použití patentních uzávěrů. (Voda sražená na krytu může být možným zdrojem kontaminace.)
- O. Pro dosažení správných výsledků testu je nezbytné adekvátní vortexování po přidání selekčního činidla.
- P. Doporučuje se vytvořit oddělenou oblast pro část hybridizačního ochranného stanovení (Hybridization Protection Assay - HPA) k minimalizaci kontaminace stanovení amplikonem. Tato určená oblast by měla být oddělena od oblastí přípravy vzorku a činidla a od amplifikačních oblastí.
- Q. Zabránění kontaminace prostředí laboratoře amplikony napomůže, pokud bude prostředí laboratoře uspořádáno do jednosměrného pracovního toku. Například postupujte od přípravy vzorku a činidla k amplifikaci a poté k oblastem HPA. Vzorky, vybavení a činidla se nesmějí vracet do oblastí, kde byl proveden předchozí krok. Rovněž personál se nesmí vracet do předchozích pracovních oblastí bez provedení řádných dekontaminačních opatření. Zvláště se doporučuje, aby biologicky bezpečný box používaný ke zpracování vzorků nebyl používán k provádění testu MTD.

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ TESTU

Test MTD využívá amplifikací zprostředkovanou transkripci (Transcription-Mediated Amplification - TMA) a hybridizační ochranné stanovení (Hybridization Protection Assay - HPA²) ke kvalitativní detekci ribozomální ribonukleové kyseliny (rRNA) komplexu *M. tuberculosis*. Test MTD bude detekovat rRNA jak z kultivovatelných, tak z nekultivovatelných organismů. Organismy komplexu *M. tuberculosis* zahrnují *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* a *M. canettii* (12,13). Test MTD bude detekovat všechny organismy spadající do komplexu *M. tuberculosis*. *M. microti* však infikuje pouze zvířata, *M. bovis* se z infikovaných zvířat na člověka přenáší jen vzácně a *M. africanum* způsobuje v tropické Africe u lidí plicní chorobu¹². *M. tuberculosis* je zdaleka nejběžnějším členem komplexu, který je v celém světě odpovědný za onemocnění lidí. Centers for Disease Control nyní hlásí nárůst incidence tuberkulózy doprovázející AIDS, cizorodých případů a zvýšení přenosů u vysoce rizikových populací^{6,9}. Došlo rovněž k nárůstu počtu kmenů *M. tuberculosis*, které jsou rezistentní na jedno nebo více antituberkulotik¹¹. Dopady těchto skutečností na veřejné zdraví jsou vážné.

Konvenční kultivační postupy mohou detekovat růst tuberkulózy již za 1 týden, ale mohou trvat až 8 týdnů^{7,10}. Pro srovnání test MTD umožňuje detekovat rRNA komplex *M. tuberculosis* během 2,5 až 3,5 hodin po započetí testu. Zatímco tedy test MTD nemůže zjistit citlivost na léčiva, může vést k rychlé a spolehlivé detekci *M. tuberculosis*. To by mohlo vést k příhodnějšímu využití izolačních zařízení, příhodnější počáteční terapii a časnější detekci a zachycení infikovaných kontaktů³.

PRINCIPY STANOVENÍ

Test MTD je dvoudílným testem, při kterém amplifikace a detekce probíhají v jediné zkumavce. Na počátku se nukleové kyseliny uvolní z bakteriálních buněk působením ultrazvuku. K denaturaci nukleových kyselin a k rozrušení sekundární struktury rRNA se použije teplo. Metoda transkripce zprostředkované amplifikací (Transcription-Mediated Amplification - TMA) firmy s využitím konstantní teploty 42 °C poté specificky amplifikuje mykobakteriální cílovou rRNA transkripci intermediátů DNA, což vede ke vzniku mnohočetných kopií amplikonu mykobakteriální RNA.

Sekvence specifické pro komplex *M. tuberculosis* se poté v RNA amplikonu detekují pomocí metody hybridizačního ochranného stanovení (Hybridization Protection Assay - HPA) firmy². Činidlo *Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent* obsahuje jednořetězcovou DNA sondu s chemiluminescenční značkou. Tato sonda je komplementární k sekvencím specifických pro komplex *M. tuberculosis*. Pokud se mezi sondou a specifickými sekvencemi vytvoří stabilní hybridy RNA:DNA, vybere se hybridizovaná sonda a změří se v luminometru Leader™.

ČINIDLA (KIT NA 50 TESTŮ)

Poznámka: Informace o H-větvích a P-větvích, které mohou být spojeny s reagensy, naleznete v knihovně bezpečnostních listů (Safety Data Sheet Library) na adrese www.hologic.com/sds.

Činidla pro test MTD jsou poskytnuta následovně:

Název činidla a jeho objem**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFICATION TRAY**

Mycobacterium Specimen Dilution Buffer (SDB) <i>Roztok pufovaný Tris obsahující < 3 % detergentu</i>	1 x 2,5 ml
Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent (A) <i>Nukleové kyseliny lyofilizované v roztoku pufovaném tris obsahujícím 5 % zbyřňovacího činidla</i>	1 x 3 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Amplification Buffer (AB) <i>Vodný roztok s obsahem konzervancí</i>	1 x 3 ml
Mycobacterium Oil Reagent (O) <i>Silikonový olej</i>	1 x 10 ml
Mycobacterium Enzyme Reagent (E) <i>Reverzní transkriptáza a RNAPolymeráza lyofilizované v HEPES pufovaném roztoku obsahujícím < 10% zbyřňovacího činidla a ≥ 15 mM N-acetyl-L-cysteinu</i>	1 x 1,5 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (EDB) <i>Roztok pufovaný Tris obsahující surfaktant a glycerol</i>	1 x 1,5 ml

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HYBRIDIZATION TRAY

Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H) <i>< 100 ng/lahviček neinfekční DNA sondy s chemiluminescenční značkou lyofilizované v jantaranem pufovaném roztoku obsahující zbyřňovací činidla a detergent</i>	1 x 6 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Hybridization Buffer (HB) <i>Jantaranem pufovaný roztok obsahující < 4 % detergentu</i>	1 x 6 ml
Mycobacterium Selection Reagent (S) <i>Borátem pufovaný roztok obsahující surfactant</i>	1 x 15 ml
Mycobacterium Lysing Tubes (LT) <i>Skleněné kuličky, zbyřňovací činidlo</i>	2 x 25 Tubes

POŽADAVKY NA SKLADOVÁNÍ A NAKLÁDÁNÍ S PŘÍPRAVKEM

A. Následující kapalné nebo nerekonstituované složky musejí být skladovány při teplotě 2 °C až 8 °C, přičemž jsou stabilní do vyznačeného data expirace:

- Mycobacterium Specimen Dilution Buffer (SDB)
- Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent (A)
- Mycobacterium Amplification Buffer (AB)
- Mycobacterium Enzyme Reagent (E)
- Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (EDB)
- Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H)

Rekonstituované Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent (A) je stabilní při teplotě 2 °C až 8 °C 2 měsíce. Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H) a Mycobacterium Enzyme Reagent (E) jsou při teplotě 2 °C až 8 °C po rekonstituci stabilní 1 měsíc nebo 2 měsíce při teplotě -20 °C nebo nižší pokud se uchovávají jako zmrazené alikvoty v den počáteční rekonstituce. Zmrazené alikvoty se musí použít v den rozmrazení. Nesmějí se používat bezzámravové mrazáky.

B. Následující složky kitu jsou stabilní při teplotě 2 °C až 25 °C do vyznačeného data expirace.

- Mycobacterium Oil Reagent (O)
- Mycobacterium Hybridization Buffer (HB)
- Mycobacterium Selection Reagent (S)
- Mycobacterium Lysing Tubes (LT)

ODBĚR VZORKU, JEHO UCHOVÁVÁNÍ, TRANSPORT A ZPRACOVÁNÍOdběr a uchovávání vzorku:

Vzorky musejí být odebrány do sterilních plastových nádob a uchovávány při teplotě 2 °C až 8 °C do té doby, než budou transportovány nebo zpracovány. Vzorky zahrnuté do klinického hodnocení nebyly před zpracováním uchovávány déle než 4 dny (obvykle méně než 24 hodin).

Transport:

Vzorky transportujte do laboratoře co nejdříve podle příslušných nařízení.

Zpracování (dekontaminace a koncentrace):

Vzorky silně znečištěné krví se pomocí testu MTD nesmějí testovat. Test MTD je určen k detekci rRNA členů komplexu *M. tuberculosis* ze sedimentů připravených z obecně přijímaných současných adaptací dekontaminačních protokolů NALC-NaOH nebo NaOH popsanych CDC pomocí 1% až 1,5% roztoku NaOH po dobu 15 až 20 minut a odstředění při $\geq 3,000 \times g$ ⁷.

Uchovávání zpracovaného sedimentu:

Sedimenty mohou být před testováním uchovávány při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 3 dní. Sedimenty mohou být také uchovávány ve zmrazeném stavu při teplotě -20 °C nebo -70 °C po dobu až 6 měsíců. Nesmějí se používat bezzámrazové mrazáky.

MATERIÁLY**A. Poskytnuté materiály**

(bioMérieux Ref. No. 39006 / Hologic kat. č. 301001)	50 testů
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS AMPLIFICATION TRAY	
Mycobacterium Specimen Dilution Buffer (SDB)	1 x 2,5 ml
Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent (A)	1 x 3 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Amplification Buffer (AB)	1 x 3 ml
Mycobacterium Oil Reagent (O)	1 x 10 ml
Mycobacterium Enzyme Reagent (E)	1 x 1,5 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (EDB)	1 x 1,5 ml
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS HYBRIDIZATION TRAY	
Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H)	1 x 6 ml (je-li v rekonstituovaném stavu)
Mycobacterium Hybridization Buffer (HB)	1 x 6 ml
Mycobacterium Selection Reagent (S)	1 x 15 ml
Mycobacterium Lysing Tubes (LT)	2 x 25 zkumavek
Uzavírací karty	1 balíček

B. Potřebný, ale nedodávaný materiál

Micropipety schopné podat 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl a 450 µl
 Vortexové mísidlo
 Sterilní voda (filtrovaná nebo autoklávaná)
 Kultivační zkumavky
 Sterilní 3mm skleněné kuličky
 Mikrocentrifugové zkumavky se šroubovým uzávěrem
 Amplifikační pozitivní buněčné kontroly (např. *M. tuberculosis*, ATCC 25177 nebo ATCC 27294)
 Amplifikační negativní buněčné kontroly (např. *M. gordonae*, ATCC 14470, nebo *M. terrae*, ATCC 15755)
 Domácí bělidlo (5,25% roztok chlomanu)
 Plastové pokrývky laboratorních stolů
 1000 µl pipetovací špičky s hydrofóbnímu zátkami

C. Další materiály dostupné u vašeho distributora firmy Hologic:

LEADER 50i Luminometer (bioMérieux ref. 39400 / Hologic kat. č. 103100i)
 Sonicator (bioMérieux ref. 39409 / Hologic kat. č. 901104)
 Detection Reagent Kit (bioMérieux ref. 39300 / Hologic kat. č. 201791)
 MTD Amplification Controls (bioMérieux ref. 39223/Hologic kat. č. 301043F)
 Dry Heat Bath ^A (42° ± 1°C, 60° ± 1°C, and 95° ± 5°C) (bioMérieux ref. 39405, 39406, 39407 / Hologic kat. č. 105524, 105524F, 105524J)
 Sonicator Rack (bioMérieux ref. 39313 / Hologic kat. č. 104027)
 Test tube racks (bioMérieux ref. 39311 / Hologic kat. č. 104769)
 Extended length pipette tips with hydrophobic plugs (1250 µL) (bioMérieux ref. 39315 / Hologic kat. č. 104316)
 Tubes, polypropylene, 12 x 75 mm (bioMérieux ref. 39308 / Hologic kat. č. 102440)
 Snap top polypropylene caps for 12 x 75 mm tubes (bioMérieux ref. 39320 / Hologic kat. č. 400713)

POSTUP TESTU

Kontroly

Buňky použité pro amplifikační pozitivní buněčnou kontrolu musejí být členem komplexu *M. tuberculosis*, jako je avirulentní H37Ra (ATCC 25177) nebo virulentní H37Rv (ATCC 27294). Buňky použité pro negativní buněčnou kontrolu musejí být MOTT, jako je *M. goodnae* (ATCC 14470) nebo *M. terrae* (ATCC 15755). Kontroly musejí být připraveny před testováním vzorku.

Buněčné kontroly musejí obsahovat 25 až 150 CFU na 50 µl, aby se dosáhlo konečné koncentrace 1 až 10 CFU na stanovení. Tato koncentrace se musí ověřit kultivací. Tyto buněčné kontroly budou použity při přípravě kontrol zpracování vzorku. (viz Příprava vzorku.)

1. Doporučená příprava buněčných kontrol
 - a. Do čisté kultivační zkumavky vložte 3 až 5 sterilních 3mm skleněných kuliček.
 - b. Přidejte 1 až 2 ml sterilní vody. Přidejte několik 1 µl kliček rostoucích bakterií z příhodné kultury. Zkumavku uzavřete a opakovaně při vysoké rychlosti vortexujte.
 - c. Suspenzi nechejte 15 minut stát.
 - d. Supernatant přeneste do čisté kultivační zkumavky. Pomocí stupnice McFarlanda upravte zákal na stupeň 1.
 - e. Připravte ředění suspenze v poměru 1:100 tak, že přidáte 100 µl McFarlandovy suspenze č. 1 do 10 ml sterilní vody. Uzavřete a vortexujte. Toto je ředění 1.
 - f. Připravte druhé ředění v poměru 1:100 tak, že přidáte 100 µl ředění 1 do 10 ml sterilní vody. Uzavřete a vortexujte. Toto je ředění 2. Toto ředění by mělo obsahovat přibližně 25 až 150 CFU na 50 µl.

Alikvotování a uchování buněčných kontrol

- a. Ředění se musí alikvotovat do čistých mikrocentrifugačních zkumavek se šroubovým uzávěrem o objemu 1,5 ml jako alikvoty na jedno použití (500 µl) a uchovávat zmrazené na teplotu -20 °C 6 měsíců nebo na teplotu -70 °C 1 rok. Nesmějí se používat bezzámrazové mrazáky.

Testování doporučených kontrol pozitivních na buňky *M. tuberculosis* bude monitorovat pouze podstatné selhání činidel. Pozitivní kontrola je určena k monitorování účinku činidel použitých při zpracování na interference z nadbytku NaOH a fosfátového pufru. Změny postupu pokud jde o časování a teploty, které mohou ovlivnit účinnost amplifikace nebo adekvátnost selekčního času nemusí být pomocí doporučených kontrol detekovány. Lze testovat další kontroly podle pokynů nebo zvláštních požadavků.

2. Kontroly inhibice vzorku

Pokud je test MTD negativní a lékař má silné podezření na to, že pacient trpí tuberkulózou, je možné zkontrolovat inhibici vzorku pomocí následujícího postupu:

- a. Do 2 Mycobacterium Lysing Tubes (LT) (naočkováná a nenaočkováná) dejte 50 µl Specimen Dilution Buffer.
- b. Do jedné zkumavky (naočkováné) přidejte 50 µl Amplification Positive Cell Control a 450 µl sedimentu. Do druhé zkumavky (nenaočkováné) přidejte 450 µl sedimentu. Test proveďte obvyklým postupem.

Interpretace

Pokud je hodnota RLU naočkováné zkumavky $\geq 30\,000$, pak vzorek neinhibuje amplifikaci a zjevně v něm nebyl přítomen žádný cíl amplifikace. Pokud je hodnota RLU naočkováné zkumavky pod 30 000, pak vzorek amplifikaci inhibuje a musí se vyhodnotit další vzorek. Pokud je opakované testování nenaočkováného vzorku pozitivní, výsledek testu MTD může být hlášen jako pozitivní. Nejpravděpodobnějším vysvětlením tohoto typu výsledku je náhodná variabilita vzorku; tj. že první alikvot neobsahoval cíl amplifikace zatímco druhý alikvot ano. Hodnota RLU nenaočkováné zkumavky může být buď pozitivní nebo negativní v důsledku toho, že alikvot sedimentu může a nemusí obsahovat rRNA *M. tuberculosis*.

3. Monitorovací kontrola laboratorní kontaminace

K monitorování kontaminace laboratoře ampikonem nebo buňkami *M. tuberculosis* lze provést následující postup:

- a. Do čisté zkumavky dejte 1 ml sterilní vody. Sterilní vodou navlhčete sterilní polyesterový nebo dakronový tampón.
- b. Setřete plochu testovaného pracovního stolu nebo zařízení.
- c. Tampón vložte do vody a mírně jím otáčejte. Tampón vyjměte, přičemž jej tlače proti stěně zkumavky. Tampón zlikvidujte do nádoby obsahující ředění domácího bělidla v poměru 1:1.
- d. Přidejte 25 µl vody obsahující materiál vytlačený z tampónu do amplifikační zkumavky obsahující 50 µl Amplification Reagent a 200 µl Oil Reagent.
- e. Při amplifikaci a detekci postupujte podle POSTUPU TESTU.

Interpretace

Pokud jsou výsledky $\geq 30\,000$ RLU, je povrch kontaminován a musí se dekontaminovat ošetřením bělidlem podle doporučení uvedeného v POSTUPU TESTU, příprava zařízení. Pokud je podezření na kontaminaci vodní lázně, lze 25 µl vody z vodní lázně amplifikovat podle postupu popsaného pro materiál z tampónu za předpokladu, že ve vodní lázni nejsou použity žádné antimikrobiální látky.

Příprava vybavení

1. Pro optimální přenos energie ultrazvuku v sonikátoru musí být voda před každým během důkladně zbavena plynu podle následujícího postupu:
 - a. K naplnění sonikační lázně po úroveň 1,27 cm pod okraj nádrže do ní napustěte dostatek vody z vodovodu o teplotě místnosti.
 - b. Sonikátor nechejte 15 minut běžet, čímž se voda důkladně zbaví plynu.
2. 1 lázeň se suchým teplem nastavte na teplotu 95 °C, 1 lázeň se suchým teplem nebo vodní lázeň na teplotu 60 °C a další lázeň se suchým teplem nebo vodní lázeň na teplotu 42 ± 1 °C.
3. Před započítím otřete pracovní povrchy, zařízení a pipetovací zařízení ředěním domácího bělidla v poměru 1:1. Bělidlo musí být v kontaktu s povrchem po dobu alespoň 15 minut. Pracovní povrchy mohou být k odstranění bělidla otřeny vodou. Povrch, na kterém se bude provádět test zakryjte plastovými pokrývkami laboratorních stolů (laboratory bench covers).
4. Připravte Leader Luminometer k provozu. Ujistěte se, zda v něm jsou dostatečné objemy detekčního činidla I a II k provedení testu a zajistěte, že hadice vedoucí činidla jsou činnidlem naplněny. Bližší informace o plnění detekčních činidel jsou v provozním manuálu k přístroji. (Detekční činidla se prodávají zvlášť).

Příprava činidel

Rekonstituujte lahvičku (50 testů) lyofilizovaného Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent (A) pomocí 3,0 ml Mycobacterium Amplification Buffer (AB). Vortexujte dokud se roztok nepromísí. *Rekonstituované* činidlo nechejte stát při teplotě místnosti dokud se nevyčefí. Rekonstituované Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent se může skladovat při teplotě 2 °C až 8 °C 2 měsíce. Rekonstituované Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent se musí nechat před použitím ohřát na teplotu místnosti.

Příprava vzorku

1. K testování vzorků a 1 každé z kontrol pozitivních či negativních na buněčnou amplifikaci (Amplification Cell Positive a Amplification Cell Negative) nebo z kontrol pozitivních a negativních na zpracování vzorku (Specimen Processing Positive and Negative Control) označte dostatečný počet Mycobacterium Lysing Tubes (LT). Sundejte uzávěry a uložte je stranou.
2. Napipetujte 50 µl Mycobacterium Specimen Dilution Buffer (SDB) do všech Mycobacterium Lysing Tubes (LT). Postupujte podle pokynů v A nebo B uvedených dále u kontrol a v C u vzorků.
 - A. Kontroly zpracování vzorků:

U každé kontroly přidejte 1 ml roztoku NALC/NaOH a 3 ml fosfátového pufru použitého ke zpracování sputa s 1 ml sterilní vody do zkumavky na zpracování vzorku.

 - i. Vortexujte.
 - ii. Přeneste 450 µl roztoku NALC/NaOH/fosfátový pufr a 50 µl ředění Cell Control do odpovídajícím způsobem označené Mycobacterium Lysing Tube (LT).
 - B. Pokud se používají Amplification Cell Controls, přeneste 450 µl Amplification Cell Control z její nádoby do odpovídajícím způsobem označené Mycobacterium Lysing Tube (LT).
 - C. Vzorek: přeneste 450 µl dekontaminovaného dobře promíchaného vzorku z jeho nádoby do odpovídajícím způsobem označené Mycobacterium Lysing Tube (LT).
3. Mycobacterium Lysing Tubes (LT) po přidání každého vzorku uzavřete.
4. 3 sekundy vortexujte.

Lýza vzorku

1. Mycobacterium Lysing Tubes (LT) vtačte do Sonicator Rack tak, aby reakční směs na dně zkumavek byla ponořena, ale uzávěry aby byly nad vodou. Sonicator Rack vložte do sonikátoru vodní lázně. ZKUMAVKY SE NESMĚJÍ DOTÝKAT DNA ANI STĚN SONIKÁTORU.
2. 15 minut sonikujte, nikoli však déle než 20 minut. Sonikované vzorky a kontroly se nyní označují jako "lyzáty". LYZÁTY NEVORTEXUJTE.

Amplifikace

1. Amplifikační zkumavky (12 x 75mm polypropylenové zkumavky) označte poblíž vrchní části zkumavky čísly, která odpovídají číslům použitým na Mycobacterium Lysing Tubes (LT). Rovněž označte amplifikační zkumavky pro každou amplifikační pozitivní a negativní kontrolu (Amplification Cell Positive Control a Amplification Cell Negative Control). Pokud se používají RNA kontroly, označte amplifikační zkumavky tak, aby odpovídaly negativní a pozitivní kontrole.
2. Na dno každé amplifikační zkumavky pomocí dávkovací pipety přidejte 50 µl *rekonstituovaného* Mycobacterium Tuberculosis Amplification Reagent. Pomocí dávkovací pipety přidejte do každé amplifikační zkumavky 200 µl Mycobacterium Oil Reagent (O).

3. LYŽÁT NEVORTEXUJTE. Při každém přenosu přeneste na dno každé řádně označené amplifikační zkumavky 25 µl lyžátu pomocí oddělené prodloužené pipetovací špičky s hydrofóbním uzávěrem. Zbývající lyžát se může uchovávat při teplotě 2 °C až 8 °C až po dobu 7 dnů nebo se může uchovávat při teplotě –20 °C nebo nižší po dobu až 1 měsíce. Bezzámrazové mrazáky se nesmějí používat. Pokud se s lyžáty pacientova vzorku mají provést další testy, nechejte lyžát ohřát na teplotu místnosti. LYŽÁT NEVORTEXUJTE.
4. Zkumavky inkubujte 15, ne však více než 20 minut při teplotě 95 °C v lázni se suchým teplem.
5. Připravte enzymovou směs přidáním 1,5 ml Mycobacterium Enzyme Dilution Buffer (EDB) do lyofilizovaného Mycobacterium Enzyme Reagent (E). Promíchejte otáčením. Nevortexujte. Rekonstituované Enzyme Reagent je při teplotě 2 °C až 8 °C stabilní 1 měsíc a 2 měsíce při teplotě –20 °C nebo nižší pokud se v den počáteční rekonstituce skladují jako zmrazené alikvoty.^B Pokud se mají se zmrazenými alikvoty provádět testy, nechejte napřed zmrazený alikvot ohřát na teplotu místnosti; alikvoty nerozmrazujte při zvýšené teplotě. K promísení alikvotů po rozmrazení před přidáním do amplifikačních zkumavek směs opatrně nasajte a vystříknete pomocí dávkovací pipety zařízení.
6. Zkumavky přeneste do lázně se suchým teplem nebo do vodní lázně s teplotou 42 ± 1 °C a 5 minut je nechejte chladnout. ZKUMAVKY NENECHÁVEJTE VYCHLADNOUT PŘI TEPLITĚ MÍSTNOSTI. VODNÍ LÁZEŇ NEZAKRÝVEJTE.
7. Do každé amplifikační zkumavky přidejte 25 µl enzymové směsi dávkovací pipetou, přičemž zkumavky jsou uchovávány při teplotě 42 ± 1 °C. Promíchejte protřepáním. Inkubujte 30, ale ne více než 60 minut při teplotě 42 °C. Během tohoto inkubačního kroku se musí použít uzavírací karty nebo patentní uzávěry. VODNÍ LÁZEŇ NEZAKRÝVEJTE.
8. Zkumavky lze po 30 minutách inkubace zakrýt a vložit do prostředí s teplotou 2 °C až 8 °C na dobu až 2 hodin nebo do prostředí s teplotou –20 °C přes noc. Pokud se uchovávají přes noc při teplotě –20 °C, musí se zkumavky před hybridizačním krokem zcela rozmrazit při teplotě místnosti nebo při teplotě ne vyšší než 60 °C. Pokud se uchovávají přes noc, je lepší použít spíše patentní uzávěry než uzavírací karty.

Hybridizace

1. Lyofilizované Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H) rekonstruuje pomocí 6 ml Mycobacterium Hybridization Buffer (HB). Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H) a Mycobacterium Hybridization Buffer (HB) musí mít před rekonstitucí teplotu místnosti. Pokud byl Mycobacterium Hybridization Buffer (HB) ochlazen, ohřívejte jej na teplotu 60 °C za mírného otáčení, aby se zajistilo, že se rozpustí všechny složky. Vortexujte do té doby, než se roztok vyčereí (to může trvat až 1 minutu), aby se zajistilo, že se všechny složky rozpustí. *Rekonstituovaný* Hybridization Reagent je při teplotě 2 °C až 8 °C stabilní 1 měsíc nebo 2 měsíce při teplotě –20 °C nebo nižší, pokud se uchová jako zmrazené alikvoty^C v den počáteční rekonstituce. Pokud bylo rekonstituované Hybridization Reagent ochlazené nebo zmrazené, ohřívejte jej na teplotu 60 °C za mírného otáčení, aby se zajistilo, že se rozpustí všechny složky.
2. Do každé zkumavky přidejte 100 µl rekonstituovaného Hybridization Reagent dávkovací pipetou. Zkumavky zakryjte víčky nebo patentními uzávěry. 3-krát vortexujte alespoň jednu celou sekundu pokaždé^D při střední rychlosti. K dosažení řádného promísení obsahu reakční zkumavky (reakčních zkumavek), zkumavky uchovávejte ve vzpřímené poloze a reakční směs nechejte při vortexování dosáhnout horní poloviny stěny zkumavky. (K zamezení možné kontaminace nenechejte reakční směs přijít do kontaktu s víčky nebo uzávěry.) Po odpovídajícím vortexování musí být reakční směs jednolitě žlutá.
3. Inkubujte 15, ne více než 20 minut při teplotě 60 °C v lázni se suchým teplem nebo na vodní lázni.

Selekce

1. Mycobacterium Selection Reagent (S) musí mít před započítím testu teplotu místnosti. Zkumavky vyjměte z vodní nebo suché lázně o teplotě 60 °C a dávkovací pipetou přidejte 300 µl Mycobacterium Selection Reagent (S). Zkumavky zakryjte uzavíracími kartami nebo patentními uzávěry. 3-krát vortexujte alespoň jednu celou sekundu pokaždé při střední rychlosti. K dosažení řádného promísení obsahu reakční zkumavky (reakčních zkumavek), zkumavky uchovávejte ve vzpřímené poloze a reakční směs nechejte při vortexování dosáhnout horní poloviny stěny zkumavky. (K zamezení možné kontaminace nenechejte reakční směs přijít do kontaktu s uzavíracími kartami nebo uzávěry.) Po odpovídajícím vortexování musí být reakční směs jednolitě růžová.
2. Inkubujte 15, ne více než 16 minut při teplotě 60 °C v lázni se suchým teplem nebo na vodní lázni.
3. Zkumavky vyjměte z vodní nebo suché lázně. Alespoň 5 minut, ne však více než hodinu, zkumavky nechejte vychladat při teplotě místnosti. Těsně před detekcí odstraňte uzavírací karty nebo patentní uzávěry.

Detekce

1. V menu softwaru luminometru zvolte příslušný protokol. Pokužijte odečítací čas 2 sekundy.
2. Pomocí navlhčené buničiny nebo papírového ručníku nepouštějícího vlákna každou zkumavku otřete, aby se zajistilo, že na vnější straně zkumavky nezůstane žádný zbytek a zkumavku vložte do luminometru podle pokynů pro obsluhu přístroje. Zkumavky se musí odečíst během 1 hodiny selekčního kroku 3.
3. Po dokončení analýzy zkumavku (zkumavky) z luminometru vyjměte.
4. Po odečtení reakčních zkumavek je opatrně naplňte až po vršek ředěním domácího bělidla v poměru 1:9s využitím stříkací láhve. Před likvidací nechejte zkumavky s bělidlem stát alespoň 1 hodinu. To napomůže zabránit kontaminaci prostředí laboratoře amplikony.
5. Stojánky na zkumavky, včetně stojánek použitých na vzorky a testy, se musí dekontaminovat úplným ponořením do ředění domácího bělidla s vodou v poměru 1:1 minimálně na 15 minut. Bělidlo se poté musí vypláchnout vodou a stojánky se musí osušit a nechat vyschnout na vzduchu.
6. Dekontaminujte laboratorní povrchy a zařízení pomocí domácího bělidla naředěného v poměru 1:1.

Opakované testování

1. Pokud se na lyzátech vzorků od pacienta provádí další testování, nechejte připravený lyzát ohřát na teplotu místnosti. LYZÁT NEVORTEXUJTE.
2. Postupujte podle protokolu POSTUP TESTU, přičemž začněte s krokem amplifikace.

POZNÁMKY K POSTUPU**A. Činidla**

1. Enzyme Reagent se po rekonstituci nesmí vystavit teplotě místnosti na dobu delší než 15 minut.
2. Mycobacterium Hybridization Buffer (HB) se může vysrážet. Ohřátí a promísení Mycobacterium Hybridization Buffer (HB) nebo *rekonstituovaného* Hybridization Reagent na teplotu 60 °C sraženinu rozpustí.

B. Teplota

1. Amplifikační, hybridizační a selekční reakce jsou závislé na teplotě; zajistěte, aby se teplota vodní nebo suché lázně udržovala ve specifikovaném rozmezí.
2. Zkumavky se musí k dosažení optimálního chodu amplifikace před přidáním směsi enzymů 5 minut chladit na teplotu 42 °C.
3. Při amplifikaci je teplota rozhodující (42 ± 1 °C).

C. Čas

Je rozhodující, aby se dodržovaly časové limity specifikované v POSTUPU TESTU.

D. Vodní lázeň

1. Hladina vody ve vodní lázni se musí udržovat taková, aby se zajistilo, že celý objem kapalného činidla reakčních zkumavkách bude pod hladinou, ale hladina nesmí být tak vysoká, aby se voda dostala do zkumavek.
2. Během amplifikačního kroku se nesmějí používat kryty vodní lázně, aby sražená voda nemohla nakapat do zkumavek nebo na ně.

E. Vortexování

Je důležité při hybridizačních a selekčních krocích mít homogenní směs, zejména po přidání *rekonstituovaného* Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent (H) (reakční směs bude jednoduše žlutá) a Mycobacterium Selection Reagent (S) (reakční směs bude jednoduše růžová).

Vortexování je manipulace roztoku s cílem vytvořit jednoduše suspenzi. Pokud jsou činidla vložena do zkumavky a je do nich zvenčí dodávána energie, navodí se rychlá rotace roztoku kolem osy zkumavky. Výsledkem této rychlé rotace je vznik jednoduše testovací suspenze. Během vortexování se zkumavky musí držet ve vzpřímené, vertikální poloze a držet v horní části zkumavky, aby se zajistilo dosažení odpovídajícího vortexování. Pokud se dosáhne odpovídajícího vortexovacího pohybu, suspenze rotuje kruhovým pohybem v rychlosti schopné zdvihnout roztok do výše dosahující horní poloviny zkumavky. Během hybridizačních a selekčních kroků se tato manipulace aplikuje postupně 3-krát, přičemž vortexování se udržuje pokaždé **alespoň 1 celou sekundu**.

INTERPRETACE TESTU

Výsledek testu vzorku při testování pomocí Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test se interpretuje na základě počátečního negativního výsledku (< 30 000 RLU), počátečního pozitivního výsledku (≥ 500 000 RLU) nebo počátečního neurčitěho výsledku (30 000 až 499 999 RLU). Test MTD se musí opakovat s využitím uloženého lyzátu pokud je počáteční výsledek neurčitý. Opakovaný výsledek získaný na lyzátu > 30 000 se považuje za pozitivní.

A. Výsledky kontroly kvality a přijatelnost

Kontroly musí dát následující hodnoty:

- Amplification Cell Negative Control < 20 000 RLU
- Amplification Cell Positive Control ≥ 500 000 RLU
- Specimen Processing Negative Control < 20 000 RLU
- Specimen Processing Positive Control ≥ 1 000 000 RLU

Výsledky testu vzorků od pacienta se nesmí hlásit pokud kontrolní hodnoty testu MTD nevyhovují výše uvedeným kritériím. Další informace viz oddíl ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ.

Cílové hodnoty kontrol se musí stanovit v každé laboratoři pomocí výsledků testu pro každou šarži připravených kontrol.

B. Výsledky testu vzorku od pacienta

Pokud kontroly nedávají očekávané výsledky, výsledky testu vzorků od pacienta ve stejném běhu se nesmějí hlásit.

Výsledky:

≥ 500 000 RLU pozitivní na rRNA komplexu *M. tuberculosis*

< 30 000 RLU negativní na rRNA komplexu *M. tuberculosis*

30 000 až 499 999 RLU pravděpodobně pozitivní na rRNA komplexu *M. tuberculosis*; pro verifikaci výsledků opakujte:

Opakujte ≥ 30 000 RLU pozitivní na rRNA komplexu *M. tuberculosis*

Opakujte < 30 000 RLU negativní na rRNA komplexu *M. tuberculosis*

HLÁŠENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky testu MTD se musí interpretovat ve spojení s dalšími laboratorními a klinickými údaji, které má klinik k dispozici. Na základě klinického podezření se musí uvážit testování dalšího vzorku.

Pokud je počáteční výsledek testu MTD pozitivní s hodnotou ≥ 500 000 RLU nebo výsledek opakovaného testu MTD pozitivní s hodnotou ≥ 30 000 RLU, pak se hlásí následující:

Hlášení:	detekována rRNA komplexu Mycobacterium tuberculosis. Mikroskopie na acidorezistentní tyčky (pozitivní nebo negativní).
Další informace:	kultivace na acidorezistentní tyčky probíhá. Vzorek může obsahovat jak MOTT, tak <i>M. tuberculosis</i> nebo <i>M. tuberculosis</i> samotný. Tento test nesmí být jediným základem diagnózy tuberkulózy. Pozitivní prediktivní hodnota u pacienta s negativní mikroskopií je nižší než u pacienta s pozitivní mikroskopií. To je obzvláště důležité u testované populace, kde je prevalence tuberkulózy nízká a pozitivní prediktivní hodnoty diagnostických metod jsou tomu odpovídajícím způsobem sníženy.

Pokud je počáteční nebo opakovaný výsledek testu MTD negativní s hodnotou <30 000 RLU, pak se hlásí následující:

Hlášení:	Nebyla detekována žádná rRNA komplexu <i>M. tuberculosis</i> . Mikroskopie na acidorezistentní tyčky (pozitivní nebo negativní).
Další informace:	Nebyla detekována žádná rRNA komplexu <i>M. tuberculosis</i> . Mikroskopie na acidorezistentní tyčky probíhá. Vzorek nemůže obsahovat <i>M. tuberculosis</i> , výsledek může být falešně negativní v důsledku nízkého počtu <i>M. tuberculosis</i> za přítomnosti nebo nepřítomnosti MOTT, nebo výsledek může být falešně negativní v důsledku interference stanovení s inhibitory vzorku. Jestliže existuje klinické podezření na tuberkulózu nebo podezření na inhibici vzorku, doporučuje se testování jiného vzorku od pacienta.

OMEZENÍ

Používejte pouze k detekci členů komplexu *M. tuberculosis* s využitím sedimentů připravených podle NALC-NaOH nebo NaOH postupů doporučených CDC⁷. Tento test se může použít pouze na sedimentech připravených

ze sputa (indukovaného nebo vykašlavaného), tracheálních aspirátů nebo bronchiálních vzorků (např. bronchoalveolárních výplachů bronchiálních aspirátů).

Test MTD je specifický pro členy komplexu *M. tuberculosis*, ale není způsobilý mezi nimi tj. mezi *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* a *M. canetti* (13) rozlišovat. *M. Celatum* a organismy podobné *M. terrae* budou zkříženě reagovat pokud jsou přítomny v koncentraci vyšší než 30 CFU (colony forming units) na test. *M. celatum* a organismy podobné *M. terrae* jsou však vzácnými klinickými izoláty.

Výsledek testu může být ovlivněn odběrem vzorku a jeho transportem, variabilitou odběru vzorku, chybami laboratorních postupů, chybnými identifikacemi vzorku a chybami transkripce. Negativní výsledek nevylučuje možnost izolace organismu komplexu *M. tuberculosis* ze vzorku.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

A. Rozmezí kontrolních hodnot pozorovaných v klinických hodnoceních

Rozmezí RLU u kontrol pozorovaná při klinickém hodnocení na 7 pracovištích bylo:

	RLU (N=704)	
	Rozmezí	Střední hodnota
Amplification Celle Positive Control	556 245 až >2 000 000	>2 000 000
Amplification Cell Negative Control	904 až 18 754	3 041

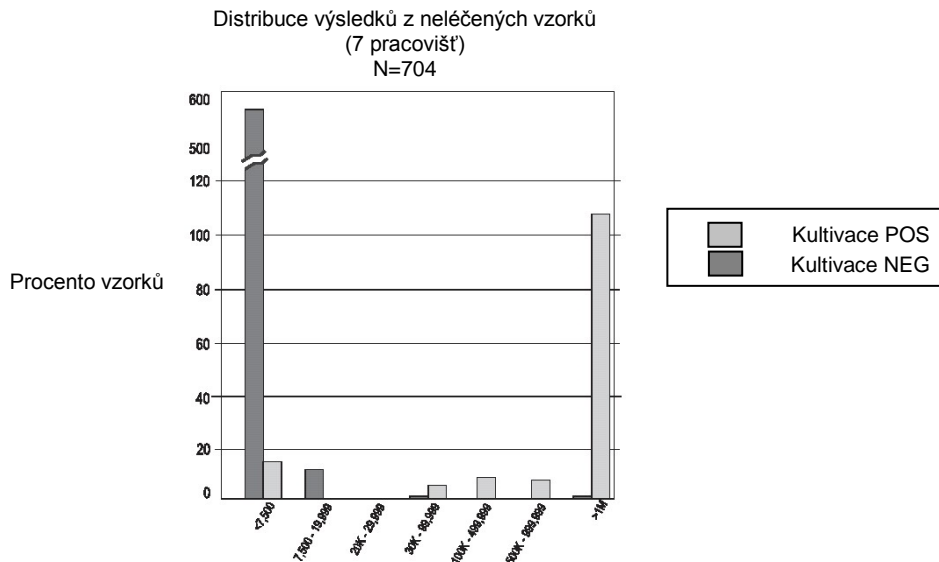
B. Rozmezí hodnot RLU u klinických vzorků

Rozmezí hodnot RLU u 127 vzorků, které byly pozitivní při testu MTD bylo 35 777 až > 2 000 000 RLU.

U 577 vzorků negativních při testu MTD bylo rozmezí hodnot 573 až 19 176 RLU.

Frekvenční distribuce hodnot RLU u všech těchto vzorků po vyřešení diskrepancí je ukázána dále:

Vyřešení diskrepancí je založeno na přítomnosti dalších kulturačně pozitivních vzorků od stejného pacienta a/nebo konečné diagnóze ošetřujícího lékaře.



Výsledky kultivace

M. Tuberculosis NEG	554	10	0	1	0	0	1
M. Tuberculosis POS	13	0	0	4	7	6	108

CHARAKTERISTIKY STANOVENÍ

A. Klinické hodnocení

Původní test MTD byl vyhodnocen ve studiích na 6 pracovištích porovnávajících výsledky mikroskopie na acidorezistentní tyčky s výsledky kultivace mykobakterií na 6 079 vzorcích od 2 609 pacientů. Z nich bylo 4 000 vzorků odebráno od 1 898 pacientů, kteří nebyli na antituberkulózní terapii. 6 pracovišť zahrnutých do studie bylo geograficky rozličných: 5 byla velká městská nemocniční střediska s centry léčení tuberkulózy a jedno bylo státní laboratoř veřejného zdravotnictví.

Formát současného testu MTD byl vyhodnocen v oddělené studii na 7 pracovištích porovnávajících výsledky testu MTD s výsledky kultivace mykobakterií. 7 pracovišť zahrnutých do studie bylo geograficky rozličných: 6 bylo velkými městskými nemocničními středisky s centry léčeni tuberkulózy přičemž jedno bylo také národní mykobakteriologickou laboratoří.

Sedmým pracovištěm byla laboratoř veřejného zdravotnictví. Byly testovány vzorky od pacientů bez terapie. Z nich bylo 132 kultivačně pozitivních na komplex *M. tuberculosis*. MTD detekovala 119 z těchto kultivačně pozitivních vzorků; u 7 vzorků vedle *M. tuberculosis* vyrostlo MOTT.

VZORKY OD NELÉČENÝCH PACIENTŮ
MTD vs. kultivace (N=704)

		PODLE PACIENTA (před rozlišením) Kultivace				PODLE PACIENTA (po rozlišení) Kultivace	
		+	-			+	-
MTD	+	54	4	MTD	+	56	2
	-	4	221		-	4	221
		PODLE VZORKU (před rozlišením) Kultivace				PODLE VZORKU (po rozlišení) Kultivace	
		+	-			+	-
MTD	+	119	8	MTD	+	125	2
	-	13	564		-	13	564

Do této studie byli zahrnuti pacienti s podezřením na aktivní plicní tuberkulózu bez terapie. Celková prevalence pacientů s pozitivní kultivací na *M. tuberculosis* byla 20,5 %.

Celková citlivost testu MTD na pacienta byla 93,3 % a specificita na pacienta byla 99,1 % ve srovnání s kultivačními výsledky. Celková citlivost testu MTD na vzorek byla 90,6 % a specificita na vzorek byla 99,6 % ve srovnání s kultivačními výsledky. Výsledky ze 7 pracovišť na citlivost, specificitu, pozitivní predikční hodnotu (Positive Predictive Value - PPV) a negativní predikční hodnotu (Negative Predictive Value - NPV) jsou uvedeny v následující tabulce spolu s 95% intervaly spolehlivosti pro odhady charakteristik stanovení. Všechna data jsou ukázána po vyřešení diskrepancí založeném na přítomnosti dalších kultivačně pozitivních vzorků od stejného pacienta a/nebo konečné diagnóze ošetřujícího lékaře.

**Podle:
pacienta:**

	Celkové procento	Počet/celkem	95% interval spolehlivosti
Citlivost	93,3%	56/60	83,8%-98,2%
Specificita	99,1%	221/223	96,8%-99,9%
PPV	96,6%	56/58	88,1%-99,6%
NPV	98,2%	221/225	95,5%-99,5%

**Podle:
vzorku:**

	Celkové procento	Počet/celkem	95% interval spolehlivosti
Citlivost	90,6%	125/138	84,4%-94,9%
Specificita	99,6%	564/566	98,7%-100%
PPV	98,4%	125/127	94,4%-99,8%
NPV	97,7%	564/577	96,2%-98,8%

Z 564 vzorků, které byly kultivačně a MTD negativní na komplex *M. tuberculosis*, 114 vzorků vyrostlo MOTT při kultivaci, 64 bylo od pacientů s jinými kultivacemi pozitivními na MOTT a 169 bylo od pacientů s negativními kultivacemi mykobakterií.

B. Studie přesnosti

Na třech pracovištích byly testovány přesnostní panely, sestávající ze 2 negativních vzorků, 2 slabě pozitivních vzorků (^a 100 CFU/test) a 2 středně silně pozitivních vzorků (^a 1000 CFU/test). Pozitivní vzorky byly připraveny doplněním nastavených středně inhibičních slitých sedimentů se známými množstvími *M. tuberculosis*. Vzorky byly testovány dvakrát za den v triplikátu na 3 pracovištích. V každém běhu byly zahrnuty pozitivní a negativní amplifikační kontroly.

Protože nebyla pozorována žádná významná variabilita mezi pracovišti ani mezi dny, byla zkombinována data ze všech 3 pracovišť a ta jsou uvedena dále. Naměřené hodnoty RLU jsou omezeny luminometrovou fotomultiplikátorovou zkumavkou. Proto hodnoty vyšší než 2 000 000 RLU jsou zkráceny. Nejsou uvedeny žádné hodnoty standardní odchylky nebo hodnoty % CV.

Studie přesnosti:

	Počet pozorování	% správných	Rozmezí (RLU)	Střední hodnota (RLU)
Vzorek 1 Silně pozitivní	108	100 %	154 103 – >2 000 000	>2 000 000
Vzorek 2 Slabě pozitivní	108	99,1 %	16 324 – > 2 000 000*	>2 000 000
Vzorek 3 Negativní	108	100 %	2 004 – 5 693	2 689
Pozitivní buněčná kontrola	54	100 %	>2 000 000	>2 000 000
Negativní buněčná kontrola	54	100 %	2 272 – 4 241	2 944
* Jedno pozorování negativní				

C. Reprodukovatelnost

Panel reprodukovatelnosti sestával z 25 vzorků Amplification Negative Controls rozmístěnými mezi každý vzorek na celkem 50 vzorků. Panel reprodukovatelnosti byl testován na 4 pracovištích. Celkem 100 % (120/120) negativních vzorků dosáhlo očekávaných výsledků a 98,8 % (79/80) pozitivních vzorků dosáhlo očekávaných výsledků.

D. Analytická specifita

Specifita testu MTD byla vyhodnocena pomocí bakterií, hub a virů. U bakterií a hub zahrnovalo testování specifity 160 kmenů (151 druhů ze 62 rodů) blízké příbuzných mykobakterií, dalších organismů způsobujících choroby dýchacích cest normální respirační flóry nebo organismů představujících průřez fylogenem. Typové kmeny byly získány od American Type Culture Collection (ATCC) a 5 izolátů bylo získáno z klinických laboratoří. Lyzáty připravené z aktivně rostoucích kultur (nebo rRNA ve 3 případech) byly vyhodnoceny testem MTD podle POSTUPU TESTU. Bylo testováno přibližně 5×10^7 CFU na reakci. Pouze kmeny komplexu *M. tuberculosis* poskytly pozitivní výsledky s výjimkou *M. celatum* a kmenů podobných *M. terrae*.

V koncentracích vyšších než 30 CFU na test poskytnou *M. celatum* a některé kmeny podobné *M. terrae* pozitivní výsledky testu MTD. Při hladině 30 CFU na test *M. celatum* poskytlo 26 772 RLU a kmeny podobné *M. terrae* daly výsledky v rozemí od 19 470 do 49 976 RLU.

E. Limity detekce

Třicet (30) kmenů *M. tuberculosis* z široké geografické palety, včetně reprezentativních na léčiva rezistentních a na léčiva citlivých kmenů, bylo detekováno testem MTD. Test MTD detekoval 1 CFU na test u všech 30 kmenů.

F. Výtěžek

Dvacet pět (25) rRNA fg *Mycobacterium tuberculosis* (ekvivalent 5 CFU na test) bylo testováno za přítomnosti přibližně 540 000 CFU na test (450 µl) následujících relevantních necílových organismů: *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* a *Rhodococcus bronchialis*. Všechny výsledky testu byly pozitivní na rRNA *M. tuberculosis* v přítomnosti těchto necílových organismů.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

POZOROVÁNÍ	MOŽNÉ PŘÍČINY	DOPORUČENÁ OPATŘENÍ
Zvýšená amplifikace kontroly negativní na buňky nebo negativní kontroly zpracování vzorku ($\geq 20\ 000$ RLU)	<ul style="list-style-type: none"> Nedostatečné promísení nebo objem přidáný po přidání Mycobacterium Selection Reagent (S). Nedostatečné pečlivé nastavení reakcí a výsledná amplifikace kontaminujících materiálů přitom zavedených. 	<p>Kompletně promíchejte. Zajistěte přidání správného objemu. Po vortexování vizuálně ověřte vznik jednotité růžového roztoku.</p> <p>Při pipetování postupujte mimořádně pečlivě. Použité reakční zkumavky se musí dekontaminovat pomocí ředění domácího bělidla v poměru 1:9 podle popisu v oddílu POSTUP TESTU.</p> <p>Povrchy laboratorních stolů, suchých lázní, vodních lázní a pipetovacích zařízení se musí dekontaminovat pomocí ředění domácího bělidla v poměru 1:1 podle popisu v oddílu POSTUP TESTU.</p>
Nízká amplifikace kontroly pozitivní na buňky nebo pozitivní kontroly zpracování vzorku ($< 500\ 000$ RLU)	<ul style="list-style-type: none"> Vynechání kroku 5 minut chlazení. Kontaminace laboratorních povrchů nebo činidel. Nedostatečné otření zkumavek před odečtem v luminometru. 	<p>Zkumavky musí být před odečtem v luminometru otřeny vlhkou buničinou nebo papírovým ručníkem nepouštějícím vlákna.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Provedení kroku amplifikace mimo doporučené teplotní rozmezí. Amplification Reagent přidáno na stěnu místo na dno zkumavky. Nedostatečné promísení po přidání rekonstituovaného Mycobacterium Tuberculosis Hybridization Reagent. Přidáno příliš mnoho Selection Reagent. Selekční krok běžel přes doporučený časový limit. Po inkubaci při 95 °C se zkumavky ochladily pod 42 °C. Ucpané hadice s detekčním činidlem. 	<p>Zkontrolujte teplotu vodní lázně a/nebo suché lázně podle potřeby k dosažení teplotních rozemzí uvedených v postupu</p> <p>Vortexujte pečlivě podle popisu. (Viz hybridizace, krok 2.) Po vortexování vizuálně zkontrolujte, zda je roztok žlutý.</p> <p>Zkontrolujte nastavení objemu pipetovacích zařízení.</p> <p>Pečlivě načasujte dobu inkubace při 60 °C v selekčním kroku na 15 minut.</p> <p>Zkumavky přenášejte přímo ze suché lázně o teplotě 95 °C do vodní lázně/suché lázně o teplotě 42 °C.</p> <p>Oplachování teplou vodou provádějte podle popisu v provozním manuálu přístroje.</p>

POZNÁMKY

- Zahřívací blok musí mít jamky s řádnými velikostmi vhodnými pro zkumavky o rozměrech 12 x 75 mm. Doporučuje se používat suchou lázeň firmy Hologic.
- Ke skladování zmrazených alikvotů se doporučují mikrocentrifugační zkumavky se šroubovým uzávěrem. Jednotlivé zmrazené alikvoty nelze pro použití zmrazit a rozmrazit více než jednou. Nesmějí se používat bezzámrazové mrazáky.
- Ke skladování zmrazených alikvotů se doporučují 5 ml kryobanky. Jednotlivé zmrazené alikvoty nelze pro použití zmrazit a rozmrazit více než jednou. Nesmějí se používat bezzámrazové mrazáky.
- V důsledku rozdílů ve vybavení vortexovacím zařízením s variacemi v nastavení rychlosti, může být potřebný delší čas vortexování. Upravte rychlost a postupujte podle pokynů k vortexování popsaných v POZNÁMKÁCH K POSTUPU, oddíl E, čímž se umožní, aby reakční směs dosáhla a udržela výšku v horní polovině zkumavky. K dosažení správných výsledků stanovení je nezbytné adekvátní vortexování podle popisu. Časy mohou být prodlouženy až na celkem 15 sekund aniž by došlo k ovlivnění výsledků testu.

LITERATURA

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 acridinim-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. **Pitcknik, 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

Podpora zákazníků: +1 800 442 9892
customersupport@hologic.com

Technická podpora: +1 888 484 4747
molecularsupport@hologic.com

Další kontaktní informace naleznete na www.hologic.com.

Hologic, Amplified MTD, a Leader jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti Hologic, Inc. nebo jejích dceřiných společností ve Spojených státech amerických nebo v jiných zemích.

Všechny ostatní ochranné známky, které se mohou objevit v tomto návodu, jsou majetkem jejich příslušných vlastníků.

Na tento výrobek se může vztahovat jeden nebo více patentů Spojených Států, které jsou uvedeny na webové stránce www.hologic.com/patents.



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

©1995 - 2018 Hologic, Inc. Všechna práva vyhrazena.
AW-12601-2601 Rev. 003 (CS)
2018-03