

**VORGESEHENE VERWENDUNG**

Das IMMY MycoDDR-Reagenzienset enthält alle erforderlichen Reagenzien für den Aufschluss und die Dekontamination von klinischen Proben für die Diagnose von Mykobakterium-Spezies.

**ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG**

Proben, bei denen eine normale, transiente oder kontaminierende Bakterienflora vermutet wird, sollten einem chemischen Dekontaminierungsverfahren unterzogen werden, das eine effektive Erholung der Mykobakterien ermöglicht. (1) Das zum Aufschluss und zur Dekontamination verwendete Verfahren und die in diesem Set genutzten Reagenzien entsprechen den von Kubica et.al beschriebenen. (2) Die schleimlösende Verbindung N-Acetyl-L-Cystein (NALC) wird mit einem Natriumhydroxid kombiniert: Natriumitratlösung, um den Schleim zu verdauen, während der hohe pH-Wert des Natriumhydroxids jegliche kontaminierenden Bakterien abtötet. Der hohe pH-Wert dieser Lösung kann darüber hinaus das Mykobakterium nach 15 bis 20 Minuten abtöten, weshalb die Zeitplanung des Aufschluss-Dekontaminations-Prozesses höchste Präzision erfordert.

Nach dem Aufschluss-Dekontaminations-Prozess ist es ebenso wichtig, dass die Lösung so schnell wie möglich wieder auf einen neutralen pH-Wert gebracht wird. Das 2,5 %-ige NaOH-Reagenz A enthält ein Reagenz zur pH-Wert-Anzeige, dessen blaue Farbe bei einem basischen pH-Wert verblasst, bis das Reagenz bei einem nahezu neutralen pH-Wert farblos wird. Auf diese Weise kann der Labortechniker die Lösung visuell titrieren. Dazu nutzt er den enthaltenen Neutralisierungspuffer B. Die sich daraus ergebende Lösung wird zentrifugiert und umgefüllt. Der zurückbleibende Sedimentrückstand der Probe wird erneut im Re-Suspensionspuffer C suspendiert.

**WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

- Nur für In-vitro-Diagnostik
- Es sollten Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden, um eine Kreuzkontamination zwischen Proben zu vermeiden. In einer retrospektiven Studie waren 16 % der 140 Fälle einer gegen mehrere Medikamente resistenten Tuberkulose das Ergebnis einer Kreuzkontamination im Labor (3)

**VORSICHTSMASSNAHMEN IN BEZUG AUF REAGENZIEN**

- Das 2,5 %-ige NaOH-Reagenz A enthält Natriumhydroxid, eine kaustische Chemikalie. Bitte seien Sie im Umgang mit dieser Lösung vorsichtig.
- Bei der Arbeit mit klinischen Proben, bei denen das Potenzial besteht, lebensfähige Tuberkulose-Zellen zu enthalten, sollten die standardmäßigen Vorsichtsmaßnahmen gegen Biogefahren durchgeführt werden. So wird die Kontaminierung oder Infektion anderer Proben oder der Labormitarbeiter verhindert.

**BEREITGESTELLTE REAGENZIEN**

Mengen gemäß REF.-Nummer					
REF	NALC (Fläschchen mit 300 mg)	2,5 %-iges NaOH- Reagenz A (Fläschchen mit 60 ml)	Neutral. Puffer B (Fläschchen mit 30 ml)	Re- Suspension Puffer C (Fläschchen mit 3 ml)	Re- Suspension Puffer C (Fläschchen mit 60 ml)
TBNN1010-2.5	10	10	Keines	Keines	Keines
TBP300-5	5	Keines	Keines	Keines	Keines
TBPN67-60	Keines	Keines	60	Keines	Keines
TBPN67-8	Keines	Keines	8 Fläschchen mit je 500 ml	Keines	Keines
TBRB30-60	Keines	Keines	Keines	60	Keines

**NICHT BEREITGESTELLTE MATERIALIEN**

- Zentrifuge
- Vortexmixer
- Sterile Pipetten
- Mikroskopplättchen
- Zentrifugenröhrchen
- TB-Medien

**REAGENZIENVORBEREITUNG**

Hinweis: Das 2,5 %-ige NaOH-Reagenz A bleibt 72 Stunden lang aktiv, nachdem das NALC-Reagenz hinzugefügt wurde. Um die besten Ergebnisse zu erzielen, entsorgen Sie bitte nach diesem Zeitraum jegliche restliche Reagenzien.

1. Lösen Sie die Kappe des Fläschchens mit dem 2,5 %-igen NaOH-Reagenz.
2. Während die Sicherheitshülle aus Plastik noch befestigt ist, brechen Sie vorsichtig den oberen Teil der Glasampulle ab, die das NALC-Pulver enthält.
3. Geben Sie das NALC-Pulver in das Fläschchen mit dem 2,5 %-igen NaOH-Reagenz. Es ist nicht notwendig, jegliches restliche NALC-Pulver zu rehydrieren, das eventuell zu diesem Zeitpunkt in der Ampulle verbleibt.

**REAGENZSTABILITÄT UND LAGERUNG**

Die MycoDDR-Reagenzien, die in diesem Paket enthalten sind, sind bei Aufbewahrung bei 15 - 30 °C bis zum angegebenen Ablaufdatum stabil.

Nach dem Mischen des 2,5 %-igen NaOH-Reagenz A und des NALC-Pulvers können Sie jegliche nicht genutzte Menge bei 2 - 8 °C bis zu 72 Stunden lang aufbewahren. Nicht einfrieren oder über 30 °C erhitzen. Bringen Sie das Produkt vor der Verwendung auf die Umgebungstemperatur.

**PROBENNAHME UND -BEHANDLUNG**

Die klinischen Proben sollten gemäß den festgelegten Protokollen und Normen genommen und transportiert werden. Bitte halten Sie sich bezüglich den erforderlichen Verfahren zu Probennahme und -transport an die lokalen Richtlinien Ihrer Einrichtung.

Alle Proben sollten gemäß den Richtlinien der Zentren für Seuchenbekämpfung und -vorbeugung der National Institutes of Health (CDC/NIH) oder den lokalen Richtlinien der Einrichtung behandelt werden, was jegliches potenziell infektiöses menschliches Serum, Blut oder andere Körperflüssigkeiten angeht. Sterilisieren Sie die Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien vor der Entsorgung durch Autoklavieren.

**VERFAHREN ZUM UMGANG MIT PROBEN**

1. Geben Sie die klinischen Proben vor der Verarbeitung (in Zentrifugenröhrchen von 50 ml) in eine geeignete Biosicherheitshaube.
2. Lösen Sie die Kappen von allen einzelnen Probenröhrchen, entfernen Sie sie jedoch nicht. Es ist wichtig, jeweils nur eine Probe zu öffnen und dem Verwechseln der Kappen vorzubeugen.
3. Pipettieren Sie (während Sie nur mit einer Probe arbeiten) aseptisch eine Menge (bis zu 10 ml) des vorbereiteten 2,5 %-igen NaOH-Reagenz A/NALC-Reagenz (siehe Abschnitt zur Reagienzenvorbereitung). Die Menge muss der Probenmenge entsprechen. Proben in höheren Mengen als 10 ml müssen auf zwei Röhrchen aufgeteilt und getrennt verarbeitet werden. Die Rückstände sollten dann gemäß den Schritten zur Bodensatzbildung/Re-Suspension kombiniert werden.
4. Ziehen Sie die Kappen auf dem Zentrifugenröhrchen und dem Vortex jeweils ca. 30 Sekunden lang fest.
5. Lassen Sie jede Probe bei Raumtemperatur 15 - 20 Minuten lang inkubieren und mischen Sie sie mit dem Vortexmixer alle 5 Minuten.
6. Entfernen Sie nach dem Schritt der Inkubation eine Kappe eines einzelnen Probenröhrchens und beginnen Sie langsam, den Inhalt eines Fläschchens mit Neutralisierungspuffer B in das Röhrchen zu gießen. Beobachten Sie die Farbe der Flüssigkeit im Röhrchen und brechen Sie das Gießen ab, sobald die Farbe der Lösung transparent bzw. farblos wird.

7. Entsorgen Sie jegliche Reste des Neutralisierungspuffers B nach der Verwendung.
8. Wiederholen Sie die Schritte 6 und 7 für jede einzelne Probe und verwenden Sie jeweils ein anderes Fläschchen mit Neutralisierungspuffer B. Verwenden Sie das Fläschchen nicht für mehrere Proben, da dies zu einer Kreuzkontaminierung und fehlerhaften Ergebnissen führen kann.
9. Drehen Sie die Kappe auf jedem Röhrchen fest zu.
10. Zentrifugieren Sie jedes Röhrchen für 15 Minuten mit 3000 x g.
11. Legen Sie die Probenröhrchen wieder in die Biosicherheitshaube.
12. Gießen Sie jegliche überstehende Flüssigkeit langsam in einen spritzfesten Behälter, der teilweise mit einem geeigneten Desinfektionsmittel gefüllt ist, oder in ein separates Einweg-Entsorgungsröhrchen, um eine Kreuzkontaminierung zu vermeiden.
13. Geben Sie mit einer sterilen Transferpipette ca. 0,5 - 1,0 ml eines einzelnen Fläschchens des Re-Suspensionspuffers C zum Rückstand und mischen Sie zur erneuten Suspension.
14. Bereiten Sie die geeigneten Abstriche für die Säure-Schnellfärbung und/oder das geimpfte Kulturmedium gemäß den Laborprotokollen vor.
15. Fügen Sie dem Rückstand mit einer sterilen Transferpipette zusätzliche 1 - 2 ml des Re-Suspensionspuffers C hinzu (gemäß den Mengenanforderungen des Labors).
16. Folgen Sie den Anweisungen des Herstellers bezüglich jeglicher weiterer Diagnoseverfahren bei dem erneut suspendierten Rückstand.

**QUALITÄTSKONTROLLE**

Untersuchen Sie die Puffer visuell auf deren Klarheit und Farblosigkeit, mit Ausnahme der Lösung des 2,5 %-igen NaOH-Reagenz A, welches von blauer Farbe sein sollte. Entsorgen Sie jegliche Reagenzien, die Ausfällung, Trübung oder Wölkchenbildung aufweisen.

**HINWEISE ZUM VERFAHREN**

Proben, die fortlaufend mit der Pseudomonas-Spezies kontaminiert sind, erfordern eventuell eine zusätzliche Behandlung mit Oxalsäure, wie beschrieben von Kent & Kubica (2).

**EINSCHRÄNKUNGEN**

Das oben ausgeführte Verfahren muss genau befolgt werden. Ungenaue Zeitplanung, Puffern, Umschütten usw. können zum Verlust der lebensfähigen Mykobakterium-Spezies und zu verfälschten Kulturergebnissen führen.

**ERWARTETE ERGEBNISSE**

Von der Erholung der lebensfähigen Mykobakterium-Spezies kann ausgegangen werden, wenn diese in der klinischen Probe enthalten sind und gemäß dieser Packungsbeilage behandelt werden.

**LEISTUNGSMERKMALE**

Die Proben, die zum Routine-Mykobakterium-Test eingehen, werden gleichzeitig unter Verwendung des IMMY Myco-DDR-Systems und des Systems von Unternehmen A verarbeitet. Bis heute wurden insgesamt 99 Proben, 38 pulmonale Proben (Auswurf, BAL, Rippenfellflüssigkeit) und 61 verschiedene Proben (Gewebe und Wunden) getestet. Von den 99 Proben wurden 10 positiv auf das Mykobakterium getestet. Die gesamte Übereinstimmung zwischen IMMY und Unternehmen A ist hervorragend (Kappa = 0,878, 95 % CI: 0,712 - 1,00).

IMMY Unt. A	Mykobakterium positiv	Mykobakterium negativ
Mykobakterium positiv	8	0
Mykobakterium negativ	2	89

**LITERATURNACHWEISE**

1. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle und R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coord. ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
3. Small, P.M., N.B. McCleeny et al., Molecular Strain Typing of Mycobacterium tuberculosis to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. J. Clin. Microbiol. 31(7):1677-1682.



MDSS Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Deutschland

VERWENDUNG VON INTERNATIONALEN SYMBOLEN	LOT	Chargenbezeichnung
	Lagerung 15-30 °C	LOT
	REF	Referenz- Nummer
	IVD	In-vitro-Diagnostik
	Ist konform mit den Anforderungen der Europäischen Union	Ausreichend für „Anzahl an“ Tests

**2,5 % NaOH**