



NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST

(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best.Nr. 39200 / Gen-Probe Kat. Nr. 2830)

**TEST D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE
ISOLE D'UNE CULTURE**

(bioMérieux réf. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

TEST DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE

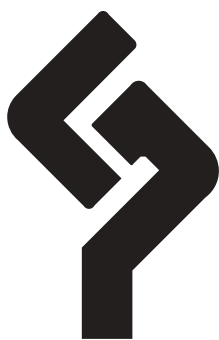
(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

**TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE
ISOLATA DA UNA CULTURA**

(bioMérieux cod. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

**NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE
IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**

(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)





AccuProbe

NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST

(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

INTENDED USE

The ACCU_{PROBE} NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from culture.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Gonorrhea is the most commonly reported bacterial infection in the United States with nearly 767,000 cases reported in 1987. This sexually transmitted disease usually results in anterior urethritis accompanied by a purulent exudate in men. In women, the disease is most often found in the cervix. While severe complications and sterility can occur in untreated individuals, asymptomatic infections are frequently diagnosed. Gonorrheal infections also may be diagnosed from other mucous membranes including the conjunctiva, anus and oropharynx (8).

Neisseria gonorrhoeae (*N. gonorrhoeae*) is the causative agent of gonorrhea. *N. gonorrhoeae* is a Gram-negative, oxidase positive diplococcus that has stringent growth requirements (3, 5, 7, 12, 14). Presumptive diagnosis of gonorrhea is based on recovery of the organism from culture, morphological examination using Gram stain and determination of the presence of cytochrome oxidase (3, 5, 9). Additionally, other confirmatory procedures for the definitive identification of gonorrheal infections include fluorescent antibody staining, carbohydrate degradation, agglutination and sugar fermentation tests (2, 4, 10, 11, 13).

The ACCU_{PROBE} NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies *N. gonorrhoeae* isolated from culture within 30 minutes.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (6). The ACCU_{PROBE} SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in a GEN-PROBE luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Reagents for the ACCU_{PROBE} NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE PROBE KIT

Probe Reagent (P) (2 x 10 tubes)
Neisseria gonorrhoeae

AccuPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

Reagent 1 (Lysis Reagent) (1) 1 x 10 mL
buffered solution containing 0.04% sodium azide

Reagent 2 (Hybridization Buffer) (2) 1 x 10 mL
buffered solution

Reagent 3 (Selection Reagent) (3) 1 x 60 mL
buffered solution

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

Detection Reagent I (RI) 1 x 240 mL
0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid

Detection Reagent II (RII) 1 x 240 mL
1 N sodium hydroxide

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal precautions when performing this assay (1).
- C. Use only for the identification of *N. gonorrhoeae* isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.
- F. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

Probe Reagent Tubes must be stored in the foil pouches at 2° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° to 25°C and are stable until the expiration date indicated.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *N. gonorrhoeae* isolated from culture.

- A. **Solid Media Method.** Growth from appropriate solid media with morphology suggestive of *Neisseria gonorrhoeae* may be tested. Samples may be tested as soon as growth is visible but should be less than 48 hours old.

1. Growth can be removed with a 1 μ L disposable plastic loop, a wire loop, a disposable plastic needle or an applicator stick. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
2. If a single colony is to be tested, it should be at least 1 mm in diameter. A 1 μ L loopful of cells or several (3 to 4) smaller colonies can be tested.
3. Avoid taking any of the solid media with the cells.
4. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.

MATERIALS PROVIDED

The ACCU**PROBE** NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST
(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

20 Tests

Probe Reagent (P)

2 x 10 tubes

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1 μ L plastic sterile inoculating loops, wire loops, plastic needles, or applicator sticks for selecting colonies.

Control culture strains

Water bath or heating block ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Micropipettes (50 μ L, 300 μ L)

Re-pipettor (50 μ L, 300 μ L)

Vortex mixer

MATERIALS AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer

(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 3100i)

GEN-PROBE Heating Block ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

ACCU**PROBE** CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 2800)

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 1791)

TEST PROCEDURE

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. Adjust the heating block or water bath to $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
2. Prepare the GEN-PROBE luminometer for operation. Make sure there is sufficient volume of Detection Reagents I and II to complete the tests.

B. CONTROLS

Positive and negative control strains should be tested routinely in each laboratory according to local regulations. A culture of *N. gonorrhoeae* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #19424) may be used as the positive control while a culture of *Neisseria meningitidis* (e.g., ATCC #13077) may be used as the negative control.

C. SAMPLE PREPARATION

1. Open the foil pouch by cutting evenly across the top of the pouch. Remove enough Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Reseal the pouch by folding the opened edge over several times and securing with adhesive tape or a clip. **Leave the desiccant pillow in the pouch.**
2. Label a sufficient number of Probe Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
3. Pipette 50 μL of Reagent 1 (Lysis Reagent) into all Probe Reagent Tubes.
4. Transfer the sample from the solid media into the labeled Probe Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop, needle or stick in the Reagent 1 (Lysis Reagent) to remove the cells.

D. HYBRIDIZATION

1. Pipette 50 μL of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Probe Reagent Tubes. Recap the Probe Reagent Tubes and mix by shaking or vortexing.
2. Incubate for 15 minutes at $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a water bath or heating block.

E. SELECTION

1. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300 μL of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and VORTEX them to mix completely.
2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 5 minutes at $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a water bath or heating block.
3. Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block and leave them at room temperature for at least 5 minutes. Remove and discard the caps. **Read the results in the luminometer within 30 minutes after removing from the water bath or heating block.**

F. DETECTION

1. Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.
2. Using a damp tissue or paper towel, wipe each tube to ensure that no residue is present on the outside of the tube and insert the tube into the luminometer according to the instrument directions.
3. When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

PROCEDURAL NOTES

- A. REAGENT: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at 35° to 60°C will dissolve the precipitate.
- B. TEMPERATURE: The Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the water bath or heating block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME: The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 5 minutes but no more than 6 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged.

- E. **VORTEXING:** It is critical to have a homogeneous mixture during the **SELECTION** Step, specifically after the addition of Reagent 3.
- F. **TROUBLE SHOOTING:**
1. Elevated negative control values (*Neisseria meningitidis* ATCC #13077) greater than 20,000 RLU (Relative Light Units) in the **LEADER** or 600 PLU (Photometric Light Units) in the **AccuLDR** (formerly **PAL**) luminometer can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
 2. Low positive control values (*N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) less than 50,000 RLU in the **LEADER** or 1,500 PLU in the **AccuLDR** (formerly **PAL**) luminometer can be caused by insufficient cell numbers or by testing mixed or aged cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.

RESULTS

A. INTERPRETATION OF RESULTS

The results of the **AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST** are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	AccuLDR (formerly PAL)	LEADER
Cut-off value	1,500 PLU	50,000 RLU
Repeat range	1,200-1,499 PLU	40,000-49,999 RLU

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *N. meningitidis*, ATCC #13077) and positive control (e.g., *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) should satisfy the following values:

	AccuLDR (formerly PAL)	LEADER
Negative control	< 600 PLU	< 20,000 RLU
Positive control	> 1,500 PLU	> 50,000 RLU

LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media mentioned in the **SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION** Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens.

Results from the **AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST** should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The **AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST** was compared to standard culture identification methods at three clinical sites using 308 isolates of *N. gonorrhoeae* and 239

other bacterial isolates representing 46 genera. Standard culture identification methods include Gram stain, oxidase reactions and a series of carbohydrate degradation tests or one of the commercially available identification methods. The isolates were categorized as either positive ($\geq 50,000$ RLU) or negative ($< 50,000$ RLU). The range of observations for negative cultures was 200 to 41,219 RLU and 56,741 to 1,072,977 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

AccuPROBE CULTURE IDENTIFICATION

AccuPROBE Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	149	0	0	124	100%/100%	100%
Site 2	104	0	0	101	100%/100%	100%
Site 3	55	0	0	14	100%/100%	100%
Total	308	0	0	239	100%/100%	100%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *N. gonorrhoeae* using 10 replicates in a single assay.

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	60,572	100,904
Standard Deviation	1,030	2,502
Coefficient of Variation	1.7%	2.5%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *N. gonorrhoeae* ribosomal RNA using single determinations in 12 consecutive runs.

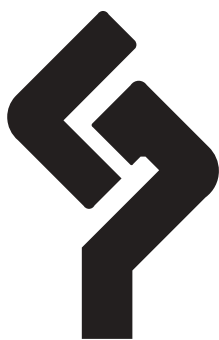
Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	55,825	97,168
Standard Deviation	4,472	6,082
Coefficient of Variation	8.0%	6.3%

C. SPECIFICITY

A total of 155 *N. gonorrhoeae* and 231 other culture isolates were evaluated using the AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 79 species from 46 genera. Fifty-six isolates of 11 species of *Neisseria*, including *N. lactamica* and *N. meningitidis*, and 67 other species from 45 genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. Only those isolates of *Neisseria gonorrhoeae* produced a positive result.

D. RECOVERY

Neisseria meningitidis was added at concentrations of 10 million cells per test alone and to samples containing between 1 thousand and 10 million cells of *N. gonorrhoeae*. *N. meningitidis* did not react in the test or interfere with the recovery of *N. gonorrhoeae* using the ACCUProbe NEISSERIA GONORRHOEAE CULTURE IDENTIFICATION TEST.





AccuProbe

NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST (bioMérieux Best.Nr. 39200 / Gen-Probe Kat. Nr. 2830)

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Der ACCUPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden-Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Neisseria gonorrhoeae* aus Kulturisolaten ermöglicht.

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Die Gonorrhoe ist mit fast 767.000 Erkrankungen im Jahr 1987 die am häufigsten gemeldete Bakterieninfektion in den Vereinigten Staaten. Diese sexuell übertragbare Krankheit manifestiert sich beim Mann im allgemeinen als Urethritis anterior mit eitrigem Ausfluß. Bei der Frau ist am häufigsten die Zervix betroffen. Während diese Infektion bei nicht behandelten Patienten zu schweren Komplikationen und Sterilität führen kann, werden häufig asymptomatische Infektionen diagnostiziert. Gonokokken-Infektionen können auch von anderen Schleimhäuten wie Bindehaut, Anus und Oropharynx diagnostiziert werden (8).

Neisseria gonorrhoeae (*N. gonorrhoeae*) ist der Erreger der Gonorrhoe. *N. gonorrhoeae* ist ein gramnegativer, oxidasepositiver Diplococcus mit besonderen Wachstumsansprüchen (3, 5, 7, 12, 14). Die präsumptive Diagnostik einer Gonorrhoe basiert auf der kulturellen Anzucht des Erregers, der morphologischen Untersuchung durch Gramfärbung und dem Nachweis von Cytochromoxidase (3, 5, 9). Weitere Tests zur Bestätigung einer Gonorrhoe umfassen z.B. den Nachweis fluoreszierender Antikörper, Kohlenhydratabbau, Agglutinationstests und Zuckerfermentationstests (2, 4, 10, 11, 13).

Der ACCUPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert *N. gonorrhoeae* aus Kulturisolaten innerhalb von 30 min.

PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (6). Der Accuprobe Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE Luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom Luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Die Reagenzien des ACCUPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P) (2 x 10 Röhrchen)
Neisseria gonorrhoeae

AccuPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZKIENKIT

Reagenz 1 (Lysereagenz) (1) 1 x 10 ml
Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid

Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) (2) 1 x 10 ml
Pufferlösung

Reagenz 3 (Selektionsreagenz) (3) 1 x 60 ml
Pufferlösung

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZKIEN-KIT

Detektionsreagenz I (RI) 1 x 240 ml
0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure

Detektionsreagenz II (RII) 1 x 240 ml
1 N Natriumhydroxyd

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (1).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *N. gonorrhoeae* aus der Kultur.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Die Reagenzien dieses Kits enthalten Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferrohren zu explosiven Metallaziden reagieren kann. Beim Ableiten in die Kanalisation sollten die Reagenzien immer mit reichlich Wasser verdünnt werden.
- F. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sondenröhrchen bei 2° - 8°C in den Aluminiumbeuteln lagern. Die original verpackten Sondenröhrchen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Beutels sind die Röhrchen 2 Monate, längstens jedoch bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Beutel müssen nach jedem Gebrauch wieder fest verschlossen werden.

Die übrigen Reagenzien des AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZKIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *N. gonorrhoeae* aus Kulturisolaten.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Festmedien angezüchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, dass es sich um *N. gonorrhoeae* handelt. Die Kulturen können getestet werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Sie sollten nicht älter als 48 Stunden sein.

1. Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
2. Wird eine einzelne Kolonie getestet, sollte diese einen Durchmesser von mindestens 1 mm haben. 1 µl Zellen (Öse) oder mehrere (3-4) kleinere Kolonien können getestet werden.
3. Achten Sie darauf, dass beim Abnehmen der Kultur kein Nährboden mit abgenommen wird.
4. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

ACCUPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
(bioMérieux Best.Nr. 39200 / Gen-Probe Kat. Nr. 2830)

20 Tests

Sondenreagenz (P)

2 x 10 Röhrchen

ERFORDERLICHE MATERIALIEN (nicht im Kit enthalten)

Sterile 1 µl Plastikösen, Metallösen oder Plastiknadeln zur Abnahme der Kolonien

Kontroll-Kulturstämme

Wasserbad oder Heizblock (60° ± 1°C)

Mikropipetten (50 µl, 300 µl)

Repetierpipetten (50 µl, 300 µl)

Vortex

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer

(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 3100i)

GEN-PROBE Heizblock (60° ± 1°C)

(bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 3397)

ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 2800)

GEN-PROBE DETEKTIONS-REAGENZIENKIT

(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 1791)

TESTDURCHFÜHRUNG

A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Den Heizblock oder das Wasserbad auf 60° ± 1°C einstellen.
2. Bereiten Sie das GEN-PROBE LEADER Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, dass für die Durchführung der Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine *N. gonorrhoeae* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC #19424) dienen, während eine *Neisseria meningitidis* Kultur (z.B. ATCC #13077) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

C. PROBENVORBEREITUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Proben und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) in alle Sondenröhrchen.
4. Überführen Sie die Probe vom festen Medium in die beschrifteten Sondenröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Wirbeln Sie die Öse oder Nadel in Reagenz 1 (Lysereagenz), so dass möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden.

D. HYBRIDISIERUNG

1. Pipettieren Sie 50 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in alle Sondenröhrchen. Verschließen Sie die Sondenröhrchen und schütteln oder vortexen Sie diese, um den Inhalt zu mischen.
2. Inkubieren Sie die Röhrchen für 15 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder Heizblock.

E. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 µl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt gleichmäßig zu durchmischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenröhrchen für 5 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und werfen Sie diese. **Die Röhrchen innerhalb der nächsten 30 min im Luminometer messen.**

F. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt werden. Stellen Sie die Röhrchen gemäß den Anweisungen im Handbuch in das Luminometer.
3. Nehmen Sie die Röhrchen nach der Messung aus dem Luminometer.

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muss deshalb unbedingt darauf geachtet werden, dass das Wasserbad oder der Heizblock im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.

- C. REAKTIONSDAUER: Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenröhrchen während des Selektionsschrittes mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.
- D. WASSERBAD: Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so dass sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenröhrchen im Wasser befindet.
- E. VORTEXEN: Während des Arbeitsschrittes SELEKTION muss besonders darauf geachtet werden, dass die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe von Reagenz 3.
- F. FEHLERMÖGLICHKEITEN
- Bei Messungen mit dem LEADER können erhöhte negative Kontrollwerte (*Neisseria meningitidis* ATCC #13077) über 20.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 600 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.
 - Schwach positive Kontrollwerte (*N. gonorrhoeae* ATCC #19424) unter 50.000 RLU auf dem LEADER oder 1500 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen oder durch Testen von Mischkulturen bzw. zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Signale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	AccuLDR (vormals PAL)	LEADER
Grenzwert	1.500 PLU	50.000 RLU
Graubereich	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die Negativkontrolle (z.B. *N. meningitidis*, ATCC #13077) und die Positivkontrolle (z.B. *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	AccuLDR (vormals PAL)	LEADER
Negativkontrolle	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Positivkontrolle	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf Festmedien (siehe Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG) angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben wurde nicht evaluiert.

Die Ergebnisse des AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 3 Laboratorien mit klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung getestet. Es wurden 308 *N. gonorrhoeae* Isolate und 239 andere Bakterienisolate aus 46 Gattungen getestet. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfassten die Gramfärbung, Oxidasereaktionen und eine Reihe von Tests zum Kohlenhydratabbau oder eine der kommerziell erhältlichen Identifizierungsmethoden. Die Stämme wurden entweder als positiv (≥ 50.000 RLU) oder negativ (< 50.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 200 bis 41.219 RLU und für die positiven Kulturen ein Bereich von 56.741 bis 1.072.977 RLU ermittelt. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

AccuPROBE / KULTUR

AccuPROBE Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent Korrelation
Labor 1	149	0	0	124	100%/100%	100%
Labor 2	104	0	0	101	100%/100%	100%
Labor 3	55	0	0	14	100%/100%	100%
Gesamt	308	0	0	239	100%/100%	100%

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der rRNA von *N. gonorrhoeae* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	60.572	100.904
Standardabweichung	1.030	2.502
Variationskoeffizient	1,7%	2,5%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen der rRNA von *N. gonorrhoeae* in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

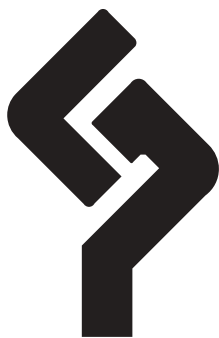
Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	55.825	97.168
Standardabweichung	4.472	6.082
Variationskoeffizient	8,0%	6,3%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 155 *N. gonorrhoeae* Stämme und 231 andere Kulturisolate mit dem AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 79 Spezies aus 46 Gattungen. 56 Isolate von 11 *Neisseria* Spezies darunter, *N. lactamica* und *N. meningitidis* und 67 Spezies von 45 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem ACUPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Nur *N. gonorrhoeae* Stämme reagierten positiv.

D. WIEDERFINDUNG

Neisseria meningitidis wurde in Konzentrationen von 10 Millionen Zellen pro Test einzeln getestet und Proben zugesetzt, die zwischen 1000 und 10 Millionen *N. gonorrhoeae* Zellen enthielten. *N. meningitidis* reagierte nicht im Test oder hat bei der Wiederfindung von *N. gonorrhoeae* zu keinen Interferenzen im AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST geführt.





AccuProbe

TEST D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE SOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

UTILISATION

Le TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE SOLE D'UNE CULTURE est un test rapide d'identification par sonde ADN de *Neisseria gonorrhoeae* isolé à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

INTRODUCTION

La gonococcie est l'infection bactérienne la plus fréquemment rencontrée aux Etats-Unis, avec près de 767.000 cas rapportés en 1987. Cette maladie sexuellement transmissible se manifeste généralement par une uréthrite antérieure, accompagnée d'exsudat purulent chez l'homme. Chez la femme, c'est généralement le col de l'utérus qui est atteint. Les infections sont souvent asymptomatiques. Or, si elles ne sont pas traitées, elles peuvent entraîner des complications graves, voire la stérilité. Les infections gonococciques peuvent également être diagnostiquées à partir d'autres muqueuses, en particulier la conjonctive, l'anus et l'oropharynx (8).

Neisseria gonorrhoeae est l'agent responsable des gonococcies; c'est un diplocoque à Gram négatif, oxydase positif, dont la croissance requiert des conditions strictes (3, 5, 7, 12, 14). Le diagnostic présomptif est basé sur l'isolement du microorganisme à partir d'une culture, l'examen morphologique après coloration de Gram, et la recherche de la cytochrome oxydase (3, 5, 9). La révélation par anticorps fluorescents, la dégradation des hydrates de carbone, l'étude de la fermentation des glucides et les tests d'agglutination permettent de confirmer le diagnostic d'une infection gonococcique (2, 4, 10, 11, 13).

Le TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE SOLE D'UNE CULTURE est une méthode rapide et objective permettant l'identification de *Neisseria gonorrhoeae* isolé à partir d'une culture en 30 minutes.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables (6). La méthode ACCU_{PROBE} utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent, complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non hybridées. Le luminomètre GEN-PROBE permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; il est négatif s'il indique une valeur inférieure.

REACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET AccuPROBE SONDE POUR NEISSERIA GONORRHOEAE

Réactif Sonde (P) (2 x 10 tubes)
Neisseria gonorrhoeae

COFFRET AccuPROBE DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) 1 x 10 ml
Solution tampon contenant 0,04% d'azide de sodium

Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) 1 x 10 ml
Solution tampon

Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) 1 x 60 ml
Solution tampon

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml
0,1% d'eau oxygénée dans une solution d'acide nitrique 0,001 N

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml
Hydroxide de sodium 1 N

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (1).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *Neisseria gonorrhoeae* isolé à partir d' une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.
- F. Éviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer à l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

Les tubes de Réactif Sonde doivent être conservés dans leur sachet en aluminium à 2° - 8°C. Avant ouverture, ils sont stables jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes doivent être utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs contenus dans le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.

PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE est conçu pour identifier *Neisseria gonorrhoeae* isolé à partir d'une culture.

- A. **Identification à partir de cultures sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, lorsqu'on observe une morphologie suggestive de *Neisseria gonorrhoeae*. L'échantillon peut être testé dès que la croissance est visible et dans les 48h après le début de la culture.
1. L'échantillon de culture peut être prélevé à l'aide d'une öse en plastique jetable de 1 µl, d'une öse métallique, d'une aiguille en plastique jetable ou d'un bâtonnet applicateur. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les bactéries vont être remises en suspension.
 2. Il est possible de tester soit le contenu d'une öse de 1 µl, soit plusieurs petites colonies (3 ou 4), soit une seule colonie d'un diamètre d'au moins 1 mm.
 3. Eviter de prélever du milieu de culture avec les bactéries.
 4. Le manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer une autre boîte de Pétri pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

MATÉRIEL FOURNI

TEST ACCU_{PROBE} D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE (bioMérieux réf. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

20 Tests

2 x 10 tubes

Réactif Sonde (P)

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Öses de 1 µl en plastique stérile, öses métalliques, aiguilles en plastique ou bâtonnets applicateurs pour prélever les colonies.

Souches de contrôle

Bain-marie ou bloc chauffant (60° ± 1°C)

Micropipettes (50 µl, 300 µl)

Pipettes répétitives (50 µl, 300 µl)

Vortex

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR GEN-PROBE

Luminomètre GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 3100i)

Bloc chauffant GEN-PROBE (60° ± 1°C)

(bioMérieux réf. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

COFFRET ACCU_{PROBE} DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES

(bioMérieux réf. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 2800)

COFFRET DE REACTIFS DE DETECTION GEN-PROBE

(bioMérieux réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 1791)

MODE OPERATOIRE

A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

1. Régler le bain-marie ou le bloc chauffant à 60° ± 1°C.

2. Préparer le luminomètre GEN-PROBE. S'assurer qu'il y ait suffisamment de Réactifs de Détection I et II pour pratiquer les tests.

B. CONTRÔLES

Des souches de contrôle positif et négatif doivent être testées en routine dans chaque laboratoire selon la réglementation en vigueur. Une souche de *Neisseria gonorrhoeae* (par exemple American Type Culture Collection, ATCC #19424) peut être utilisée comme contrôle positif, et une souche de *Neisseria meningitidis* (par exemple ATCC #13077) peut être utilisée comme contrôle négatif.

C. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1. Découper horizontalement la partie supérieure des sachets en aluminium. Retirer le nombre nécessaire de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Refermer le sachet hermétiquement en rabattant plusieurs fois son extrémité et en la fixant à l'aide de ruban adhésif ou d'une pince. **Ne pas retirer le sachet dessicant.**
2. Identifier un nombre suffisant de tubes de Réactif Sonde pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Ôter et conserver les bouchons.
3. Distribuer 50 µl de Réactif 1 (Réactif de Lyse) dans tous les tubes de Réactif Sonde.
4. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide dans les tubes de Réactif Sonde suivant les instructions du paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Agiter l'öse, l'aiguille ou le bâtonnet dans le Réactif 1 (Réactif de Lyse) et mélanger soigneusement pour remettre les microorganismes en suspension.

D. HYBRIDATION

1. Distribuer 50 µl de Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans chaque tube de Réactif Sonde. Refermer les tubes et les agiter manuellement ou à l'aide d'un Vortex.
2. Incuber les tubes pendant 15 minutes à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ au bain-marie ou dans un bloc chauffant.

E. SÉLECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'aide d'un VORTEX pour obtenir un mélange homogène.
2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 minutes à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ au bain-marie ou dans le bloc chauffant.
3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Ôter et jeter les bouchons. **Lire les résultats à l'aide du luminomètre dans les 30 minutes qui suivent le retrait du bain-marie ou du bloc chauffant.**

F. DÉTECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin d'enlever tout résidu de la surface des tubes, les essuyer à l'aide de papier absorbant humide. Placer ensuite les tubes dans le luminomètre et suivre les instructions.
3. Lorsque l'analyse est terminée, retirer les tubes du luminomètre.

REMARQUES

- A. **RÉACTIFS:** Le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer à 35° - 60°C et l'agiter pour dissoudre le précipité.
- B. **TEMPÉRATURE:** L'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent il est impératif que le bain-marie et le bloc chauffant soient maintenus à la température préconisée.
- C. **DURÉE DES OPÉRATIONS:** Les réactions d'hybridation et de sélection sont dépendantes du temps. L'hybridation doit durer au moins 15 minutes, mais pas plus de 20 minutes. Pendant l'étape de SÉLECTION, incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes mais pas plus de 6 minutes.
- D. **BAIN-MARIE:** Le niveau d'eau dans le bain-marie doit être suffisamment élevé pour que la totalité du liquide réactionnel des tubes de Réactif Sonde soit immergée.
- E. **UTILISATION DU VORTEX:** Il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant l'étape de SÉLECTION, plus particulièrement après addition du Réactif 3.
- F. **RESOLUTION D'INCIDENTS:**
- Des valeurs de contrôle négatif élevées (*Neisseria meningitidis*, ATCC #13077), supérieures à 20.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou à 600 PLU (Photometric Light Units) sur l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être dûes soit à une homogénéisation insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit à la présence simultanée de plusieurs types de colonies. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu gélosé approprié et le mettre à incuber.
 - Des valeurs de contrôle positif faibles (*Neisseria gonorrhoeae*, ATCC #19424) inférieures à 50.000 RLU sur le LEADER ou à 1.500 PLU sur l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de bactéries est insuffisant ou lorsque le test est effectué sur des cultures mixtes ou âgées. Pour vérifier si l'on est en présence d'une culture mixte, repiquer une partie de l'échantillon sur un milieu gélosé approprié et le mettre à incuber.

RÉSULTATS**A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété.

	AccuLDR (anciennement PAL)	LEADER
Valeur seuil	1.500 PLU	50.000 RLU
Zone d'incertitude	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par exemple *N. meningitidis*, ATCC #13077) et positifs (par exemple *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	LEADER
Contrôle négatif	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Contrôle positif	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur les milieux solides cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques n'ont pas été évaluées.

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique. Ces méthodes ont été mises en oeuvre sur trois sites cliniques sur 308 souches de *Neisseria gonorrhoeae*, et 239 autres souches bactériennes issues de 46 genres différents. Les méthodes d'identification comprenaient l'examen microscopique après coloration de Gram, la recherche d'oxydase, ainsi qu'une série de tests de dégradation des hydrates de carbone ou l'une des autres méthodes d'identification disponibles dans le commerce. Les souches ont été classés en deux catégories : soit positives (≥ 50.000 RLU), soit négatives (< 50.000 RLU). Les observations ont montré que les cultures négatives donnaient des résultats compris entre 200 et 41.219 RLU et les cultures positives des résultats compris entre 56.741 et 1.072.977 RLU. La comparaison de ces résultats avec ceux des méthodes d'identification classiques figure dans le tableau ci-dessous :

AccuPROBE Culture	ACCUPROBE / CULTURE					Sensibilité/ Spécificité	Pourcentage d'acceptabilité
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg			
Site 1	149	0	0	124		100%/100%	100%
Site 2	104	0	0	101		100%/100%	100%
Site 3	55	0	0	14		100%/100%	100%
Total	308	0	0	239		100%/100%	100%

PERFORMANCES

A. PRECISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE a été calculée en analysant deux concentrations d'ARNr de *Neisseria gonorrhoeae*, 10 fois dans une même série.

Echantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne	60.572	100.904
Ecart-type	1.030	2.502
Coefficient de variation	1,7%	2,5%

B. PRECISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en testant les 2 mêmes concentrations d'ARNr de *Neisseria gonorrhoeae* au cours de 12 séries distinctes.

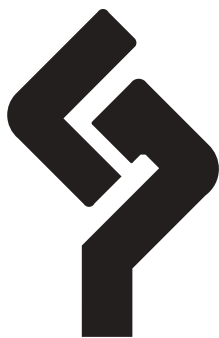
Echantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne	55.825	97.168
Ecart-type	4.472	6.082
Coefficient de variation	8,0%	6,3%

C. SPECIFICITE

Un total de 155 souches de *N. gonorrhoeae* et 231 autres souches bactériennes ont été soumises au TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE, soit un total de 79 espèces issues de 46 genres. Cinquante six souches de 11 espèces de *Neisseria*, dont *N. lactamica* et *N. meningitidis*, et 67 autres espèces issues de 45 genres représentant une intersection phylogénétique ont été testés à l'aide du TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE. Seules les souches de *Neisseria gonorrhoeae* ont donné des résultats positifs.

D. TEST DE SURCHARGE

Neisseria meningitidis a été ajouté à une concentration de 10 millions de bactéries par test à des échantillons contenant entre 1.000 et 10 millions de *N. gonorrhoeae*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée avec le TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLE D'UNE CULTURE.





AccuProbe

TEST DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE

(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

UTILIZACION

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE es un test rápido con sonda de ADN que utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae* aislada en cultivo.

INTRODUCCION

La gonorrea es la infección bacteriana más común en Estados Unidos, con aproximadamente 767.000 casos registrados en 1987. Esta enfermedad de transmisión sexual se expresa habitualmente en una uretritis anterior acompañada por un exudado purulento en el varón. En las mujeres, la enfermedad se localiza más frecuentemente en el cuello del útero. Las infecciones son frecuentemente asintomáticas. Ahora bien, si no son tratadas, pueden producir complicaciones graves, incluso esterilidad. Las infecciones gonocócicas también pueden diagnosticarse a partir de otras mucosas, incluyendo la conjuntiva, la mucosa anal y la orofaringe (8).

Neisseria gonorrhoeae (*N. gonorrhoeae*) es el agente causante de la gonorrea. *N. gonorrhoeae* es un diplococo Gram negativo, oxidasa positivo cuyo crecimiento requiere condiciones estrictas (3, 5, 7, 12, 14). El diagnóstico presuntivo de la gonorrea se basa en la recuperación del organismo a partir de un cultivo, del examen morfológico utilizando tinción Gram y en la determinación de la presencia de citocromo oxidasa (3,5,9). El revelado con anticuerpos fluorescentes, la degradación de los hidratos de carbono, los tests de aglutinación y el estudio de fermentación de los azúcares permiten confirmar el diagnóstico de una infección gonocócica.(2, 4, 10, 11, 13).

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE es un método rápido que permite identificar en 30 minutos *N. gonorrhoeae* aislada a partir de cultivo por detección de secuencias de ARN ribosomal específicas.

PRINCIPIO

Los tests de hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de cadenas complementarias de ácidos nucleicos para alinearse de forma específica y asociarse para formar complejos bicatenarios estables (6). El SISTEMA ACCUPROBE utiliza una sonda monocatenaria de ADN conjugada con un marcador quimioluminiscente complementario del ARN ribosómico del organismo diana. Después de la liberación del ARN ribosómico del organismo, la sonda de ADN marcada se combina con el ARN ribosómico del organismo diana para formar un híbrido ADN-ARN estable. El Reactivo de Selección permite la diferenciación de la sonda no hibridada y la hibridada. El luminómetro GEN-PROBE permite medir la señal luminosa emitida por los híbridos ADN-ARN. El resultado es positivo si el luminómetro indica un valor superior o igual al valor umbral; es negativo si indica un valor inferior.

REACTIVOS

Los reactivos para el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE son suministrados en tres kits separados de reactivos:

EQUIPO SONDA AccuPROBE para NEISSERIA GONORRHOEAE

Reactivo Sonda (P) (2 x 10 tubos)
Neisseria gonorrhoeae

EQUIPO DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS AccuPROBE

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) 1 x 10 ml
Solución tampón que contiene 0,04% de azida sódica

Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) (2) 1 x 10 ml
Solución tampón

Reactivo 3 (Reactivo de Selección) (3) 1 x 60 ml
Solución tampón

EQUIPO DE REACTIVO DE DETECCION GEN-PROBE

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml
Peróxido de hidrógeno 0,1% en ácido nítrico 0,001 N

Reactivo de Detección II (RII) 1 x 240 ml
Hidróxido de sodio 1 N

PRECAUCIONES DE EMPLEO

- A. Para diagnóstico *in vitro* únicamente.
- B. Observar las precauciones habituales cuando se realiza este ensayo (1).
- C. Utilizar sólo para la identificación de *N. gonorrhoeae* aislada a partir de un cultivo.
- D. Utilizar sólo el material de laboratorio suministrado o material recomendado desechable.
- E. Los reactivos de este equipo contienen azida sódica que puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre, formando azidas metálicas explosivas. En el momento de desechar estos reactivos, diluir siempre el material con un volumen considerable de agua para prevenir la acumulación de azidas en las tuberías.
- F. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Enjuagar con agua si estos reactivos entran en contacto con la piel. Si se producen salpicaduras de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

CONSERVACION

Los Tubos de los Reactivos Sonda deben ser conservados en las bolsas de aluminio entre 2° y 8°C. Los Tubos de Reactivo Sonda son estables en las bolsas sin abrir hasta la fecha de caducidad indicada. Una vez abierta, la bolsa debe ser nuevamente cerrada herméticamente y los tubos deben ser utilizados en los dos meses siguientes y antes de la fecha de caducidad.

Otros reactivos utilizados en el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE pueden ser conservados entre 2° y 25°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

TOMA DE MUESTRA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE está diseñado para identificar *N. gonorrhoeae* aislada en cultivo.

- A. **Identificación a partir de cultivo sobre medio sólido.** El test puede realizarse sobre cultivos realizados sobre medio sólido apropiado, cuando se observa una morfología sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae*. Las muestras pueden ser analizadas apenas el crecimiento es visible, y antes de las 48 horas desde que se realizó la siembra.
1. La muestra de cultivo puede ser tomada con un asa de plástico desechable, un asa metálica, una lanceta de plástico desechable o un bastoncillo aplicador. No deben utilizarse torundas dado el pequeño volumen de líquido en el cual serán a continuación puestas en suspensión las células.
 2. Es posible analizar el contenido de un asa de 1 µl, de varias colonias pequeñas (3 o 4), o bien de una única colonia de un diámetro de al menos 1 mm.
 3. Evitar tomar medio sólido junto con las células.
 4. El usuario puede elegir inocular otra placa de cultivo al mismo tiempo, para confirmar la pureza de la colonia aislada.

MATERIAL SUMINISTRADO

TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE
(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

Reactivo Sonda (P)

20 Tests

2 x 10 tubos

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Asas de inoculación estériles de plástico de 1 µl, asas metálicas, agujas metálicas o bastoncillos aplicadores para seleccionar las colonias.

Cepas de cultivo de control

Baño maría o bloque calefactor (60° ± 1°C)

Micropipetas (50 µl, 300 µl)

Pipetas de repetición (50 µl, 300 µl)

Agitador tipo Vortex

MATERIALES DISPONIBLES EN SU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 3100i)

Bloque calefactor GEN-PROBE (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

EQUIPO DE REACTIVOS DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS AccuPROBE

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 2800)

EQUIPO DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 1791)

TECNICA

A. PREPARACION DEL MATERIAL

1. Ajustar el bloque calefactor o baño maría a 60° ± 1°C.

2. Preparar el luminómetro GEN-PROBE. Verificar que hay un volumen suficiente de Reactivos de Detección I y II para completar los tests.

B. CONTROLES

Las cepas de control positivo y negativo deben ser analizadas rutinariamente en cada laboratorio conforme a la reglamentación en vigor. Un cultivo de *N. gonorrhoeae* (p. ej., American Type Culture Collection, ATCC #19424) puede utilizarse como control positivo mientras que un cultivo de *Neisseria meningitidis* (p. ej., ATCC #13077) puede ser utilizado como control negativo.

C. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

1. Abrir la bolsa de aluminio cortando la parte superior de la bolsa de aluminio. Retirar suficientes Tubos de Reactivo Sonda como para analizar las muestras de cultivo y/o los controles. Volver a cerrar herméticamente la bolsa plegando varias veces el lado abierto y fijándolo con una cinta adhesiva o un clip. **Dejar la bolsita desecante en la bolsa.**
2. Identificar un número suficiente de Tubos de Reactivos Sonda para analizar las muestras de cultivo y/o los controles. Retirar y conservar los tapones.
3. Pipetear 50 µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) en todos los Tubos de Reactivo Sonda.
4. Transferir la muestra desde el medio sólido a los Tubos de Reactivo Sonda, tal como se describe en la Sección TOMA DE MUESTRA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Agitar el asa, aguja o bastoncillo en el Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y mezclar cuidadosamente para poner en suspensión los microorganismos.

D. HIBRIDACION

1. Pipetear 50 µl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los Tubos de Reactivo Sonda. Volver a tapar los Tubos de Reactivo Sonda y mezclar agitando manualmente con la ayuda del Vortex.
2. Incubar durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño maría o bloque calefactor.

E. SELECCION

1. Retirar los Tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor. Retirar y conservar las tapas. Pipetear 300 µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo. Volver a tapar los tubos y agitarlos con la ayuda de un Vortex para obtener una mezcla homogénea.
2. Incubar los Tubos de Reactivo sonda durante 5 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en baño maría o bloque calefactor.
3. Retirar los Tubos de Reactivo Sonda del baño maría o bloque calefactor y dejarlos a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos. Retirar y desechar los tapones. **Leer los resultados en el luminómetro en los 30 minutos siguientes.**

F. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado del menú del software del luminómetro.
2. Con el fin de eliminar todos los residuos de la superficie de los tubos, limpiarlos con la ayuda de un paño o una toalla de papel húmedos. Colocar en seguida el tubo en el luminómetro conforme a las instrucciones del instrumento.
3. Cuando el análisis ha terminado, retirar el o los tubos del luminómetro.

ADVERTENCIAS

- A. **REACTIVO:** El reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar. Calentar y mezclar la solución entre 35° y 60°C para disolver el precipitado.
- B. **TEMPERATURA:** Las reacciones de Hibridación y Selección son termodependientes. Por lo tanto, es imperativo que el baño maría o el bloque calefactor se mantengan dentro de los límites de temperatura especificados.
- C. **TIEMPO:** Las reacciones de Hibridación y Selección son dependientes de tiempo. La hibridación debe durar al menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCIÓN, incubar los tubos de Reactivo Sonda durante al menos 5 minutos pero no más de 6 minutos.
- D. **BAÑO MARIA:** El nivel del agua en el baño maría debe ser suficientemente elevado para que la totalidad del líquido de reacción de los tubos de Reactivo Sonda esté sumergido.
- E. **UTILIZACION DEL VORTEX:** Es fundamental contar con una mezcla homogénea durante la Etapa de SELECCION, específicamente después de añadir el Reactivo 3.
- F. **RESOLUCION DE INCIDENTES:**
- Valores elevados de control negativo (*Neisseria meningitidis* ATCC #13077), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units) en el LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units) en el luminómetro AccuLDR (antes PAL) pueden ser causados por una homogeneización insuficiente después de agregar el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o por presencia simultánea de varios tipos de colonias. Dado que pueden producirse cultivos mixtos, una parte de la muestra puede ser sembrada en un medio de agar apropiado para ser incubada con el fin de verificar si existen múltiples tipos de colonias.
 - Valores de control positivo bajos (*N. gonorrhoeae*, ATCC #19424), inferiores a 50.000 RLU en el LEADER o a 1.500 PLU en el luminómetro AccuLDR (antes PAL) pueden ser causados por un número insuficiente de células o por analizar cultivos mixtos o cultivos envejecidos. Para verificar si estamos en presencia de un cultivo mixto, repicar una parte de la muestra sobre un medio sólido apropiado y ponerlo a incubar.

RESULTADOS**A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS**

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE se interpretan en función de un valor umbral. Las muestras que producen señales superiores o iguales a estos valores umbral son consideradas positivas. Las señales inferiores a estos valores umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se sitúa en la zona de incertidumbre, el test debe repetirse.

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Valor umbral	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona de incertidumbre	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El control negativo (p. ej., *N. meningitidis*, ATCC #13077) y el control positivo (p. ej., *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) deben cumplir con los siguientes valores:

	AccuLDR (antes PAL)	LEADER
Control negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Control positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES

Este método ha sido aplicado utilizando cultivos frescos en medios sólidos mencionados en la Sección TOMA DE MUESTRA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. La eficacia del test realizado directamente sobre muestras clínicas no ha sido demostrada.

Los resultados del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE deben ser interpretados junto con otros datos de laboratorio y correlacionados con los datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE fue comparado con métodos clásicos de identificación de cultivos en tres centros, utilizando 308 muestras aisladas de *N. gonorrhoeae* y otras 239 muestras bacterianas que representan 46 géneros. Los métodos de identificación de cultivos incluyen la tinción de Gram, la investigación de la oxidasa y una serie de tests de degradación de los hidratos de carbono, o algunos de los métodos de identificación disponibles en el mercado. Las cepas se clasificaron en dos categorías : como positivas (≥ 50.000 RLU) o negativas (< 50.000 RLU). El rango de las observaciones a partir de cultivos negativos fue de 200 a 41.219 RLU, y de 56.741 a 1.072.977 RLU para los cultivos positivos. Una comparación de estos resultados con los métodos standard de identificación de cultivos se presenta a continuación.

IDENTIFICACION DE CULTIVOS AccuPROBE

AccuPROBE Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Porcentaje Conformidad
Sitio 1	149	0	0	124	100%/100%	100%
Sitio 2	104	0	0	101	100%/100%	100%
Sitio 3	55	0	0	14	100%/100%	100%
Total	308	0	0	239	100%/100%	100%

CARACTERISTICAS

A. PRECISION INTRA- ENSAYO

La precisión intra-ensayo del TEST ACCUPRBE DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE se calculó analizando dos concentraciones de ARNr de *N. gonorrhoeae* 10 veces en una misma serie.

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media	60.572	100.904
Desviación estándar	1030	2.502
Coficiente de variación	1,7%	2,5%

B. PRECISION INTER- ENSAYO

La precisión inter - ensayo fue calculada analizando las mismas dos concentraciones de ARN ribosómico de *N. gonorrhoeae* en el curso de 12 series distintas.

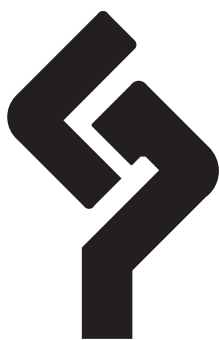
Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media	55.825	97.168
Desviación estándar	4.472	6.082
Coefficiente de variación	8,0%	6,3%

C. ESPECIFICIDAD

Fueron evaluados un total de 155 cultivos aislados de *N. gonorrhoeae* y 231 de otros cultivos utilizando el TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE. Estos cultivos aislados representaban en total 79 especies de 46 géneros. Cincuenta y seis cultivos aislados de 11 especies de *Neisseria*, incluyendo *N. lactamica* y *N. meningitidis*, y 67 de otras especies de 45 géneros, que representaban una intersección filogenética fueron evaluados utilizando el TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE Sólo las cepas aisladas de *Neisseria gonorrhoeae* dieron un resultado positivo.

D. TEST DE SOBRECARGA

Neisseria meningitidis fue añadida en concentraciones de 10 millones de células por test en muestras que contenían entre mil y 10 millones de células de *N. gonorrhoeae*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada con el TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE.





AccuProbe

TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

IMPIEGO

Il TEST AccuPROBE per l'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA è un test per l'identificazione rapida mediante sonda a DNA della *Neisseria gonorrhoeae* isolata a partire da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Con oltre 767.000 casi registrati nel 1987, la gonorrea è l'infezione batterica a più consistente diffusione negli Stati Uniti. Questa malattia a trasmissione sessuale si manifesta in genere mediante uretrite, accompagnata nell'uomo da essudato purulento. Nelle donne viene solitamente colpito il collo uterino. Se da un lato i casi non trattati possono portare a gravi quadri clinici, addirittura alla sterilità, dall'altro le infezioni asintomatiche non sono fenomeni rari. La diagnosi delle infezioni gonococciche può essere effettuata anche a partire da altre mucose, in particolare la congiuntiva, l'ano e l'orofaringe (8).

Neisseria gonorrhoeae è l'agente responsabile delle infezioni da gonococco; si tratta di un diplococcus Gram negativo, ossidasi positivo, la cui crescita richiede rigide condizioni (3, 5, 7, 12, 14). La diagnosi delle infezioni gonococciche si basa sull'isolamento del microrganismo a partire da una coltura, sull'esame microscopico dopo colorazione Gram e sulla ricerca della citocromo ossidasi (3, 5, 9). Per confermare la diagnosi di una infezione sostenuta da gonococco è possibile utilizzare altre metodiche, come ad esempio la rivelazione mediante anticorpi fluorescenti, la degradazione degli idrati di carbonio, lo studio della fermentazione degli zuccheri e i test di agglutinazione (2, 4, 10, 11, 13).

Il TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA rappresenta un metodo rapido e oggettivo di identificazione del *N. gonorrhoeae* mediante l'individuazione di sequenze specifiche di RNA ribosomale.

PRINCIPIO OPERATIVO

I test d'ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare composti stabili a doppia catena (6). Il SISTEMA AccuPROBE impiega una sonda DNA a catena singola – associata a un marker chemioluminescente – complementare all'RNA ribosomale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sequenze omologhe, formando un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione permette di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro GEN-PROBE consente di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore uguale o superiore al valore soglia, negativo se mostrerà un valore inferiore.

REAGENTI

I reagenti impiegati nel TEST ACCUProbe PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER ACCUProbe NEISSERIA GONORRHOEAE

Reagente Sonda (P) (2 x 10 provette)
Neisseria gonorrhoeae

KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCUProbe

Reagente 1 (Reagente di Lisi) (1) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide

Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) (2) 1 x 10 ml
Soluzione tamponata

Reagente 3 (Reagente di Selezione) (3) 1 x 60 ml
Soluzione tamponata

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE GEN-PROBE

Reagente di Rivelazione I (RI) 1 x 240 ml
0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N

Reagente di Rivelazione II (RII) 1 x 240 ml
Idrossido di sodio 1 N

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni (1).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione della *N. gonorrhoeae* isolata a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle tubature e formare composti esplosivi. Durante l'eliminazione di tali reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti all'interno delle tubature.
- F. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi o delle mucose con i Reagenti di Identificazione I e II. In caso di contatto, lavare ripetutamente ed accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli abbondantemente con acqua e risciacquare la superficie prima di asciugare.

CONSERVAZIONE

Le provette di Reagente Sonda devono essere conservate nelle confezioni di alluminio a temperature comprese tra 2° e 8°C. Prima dell'apertura rimangono stabili fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, la confezione deve essere chiusa ermeticamente e le provette devono essere usate nell'arco di due mesi, entro la data di scadenza.

Gli altri reagenti utilizzati nel kit ACCUProbe PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA possono essere conservati a una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA è stato studiato e realizzato per identificare la *N. gonorrhoeae* isolata a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su terreni solidi adeguati quando si osserva una morfologia indicante la *Neisseria gonorrhoeae*. Il campione può essere testato non appena risulti visibile la crescita e nelle 48 ore successive all'inizio della coltura.
1. Il campione di coltura può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica ovvero un ago in plastica monouso. Data la bassa quantità di liquido in cui i batteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non utilizzare tamponi
 2. Esiste la possibilità di testare il contenuto di un'ansa da 1 µl ovvero di numerose piccole colonie (3 o 4), oppure di un'unica colonia il cui diametro sia almeno di 1 mm.
 3. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i batteri.
 4. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un'altra piastra di Petri per confermare la purezza del campione.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

20 Test

2 x 10 provette

Reagente Sonda (P)

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

Anse da 1 µl in plastica sterile, anse metalliche, aghi in plastica o bacchette di applicazione per il prelievo delle colonie.

Cepi di controllo delle colture

Bagnomaria o incubatore (60° ± 1°C)

Micropipette (50 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso (50 µl, 300 µl)

Vortex

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 3100i)

Incubatore GEN-PROBE (60° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)

KIT DI REAGENTI D'IDENTIFICAZIONE DI COLTURE AccuPROBE

(bioMérieux cod. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 2800)

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Impostare l'incubatore o il sistema a bagnomaria ad una temperatura di 60° ± 1°C.

2. Preparare il luminometro GEN-PROBE. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per effettuare i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio devono essere testati sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, conformemente alla normativa in vigore. È possibile utilizzare una coltura di *N. gonorrhoeae* (ad es., American Type Culture Collection, ATCC #19424) come controllo positivo e una coltura di *Neisseria meningitidis* (ad es., ATCC #13077) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni in alluminio. Prelevare il numero necessario di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Richiudere ermeticamente la confezione ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare la confezione di agenti essiccanti.**
2. Predisporre un numero sufficiente di Reagenti Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Dispensare 50 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) in tutte le provette di Reagente Sonda.
4. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido nelle provette di Reagente Sonda, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Agitare l'ansa, l'ago o la bacchetta nel Reagente 1 (Reagente di Lisi) per rimettere i microrganismi in sospensione.

D. IBRIDAZIONE

1. Dispensare 50 µl di Reagente 2 (Tampone d'Ibridazione) in ogni provetta di Reagente Sonda. Richiudere le provette di Reagente Sonda e agitare manualmente o mediante un Vortex.
2. Mettere in incubazione per 15 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o nell'incubatore.

E. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 µl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitarle mediante un Vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere in incubazione le provette di Reagente Sonda per 5 minuti a 60° ± 1°C a bagnomaria o nell'incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente per almeno 5 minuti. Togliere e gettare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro, leggere i risultati del test nei 30 minuti successivi.**

F. LETTURA

1. Selezionare il protocollo giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire con attenzione le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone d'ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e agitarlo con un Vortex per sciogliere il precipitato.
- B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.
- C. TEMPO: Le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la fase di SELEZIONE, mettere in incubazione le provette di Reagente Sonda per 5 minuti senza però superare il tempo limite di 6 minuti.
- D. BAGNOMARIA: Il livello dell'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommerso.
- E. USO DEL VORTEX: È fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'aggiunta del reagente 3.
- F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI:
1. Alti valori di controllo negativo (*Neisseria meningitidis* ATCC #13077) superiori a 20.000 RLU (Relative Light Units) sul LEADER o a 600 PLU (Photometric Light Units) sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'aggiunta del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando si è in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare se si tratta di una colonia mista, è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla a incubare.
 2. Bassi valori di controllo positivo (*N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) inferiori a 50.000 RLU sul LEADER o a 1.500 PLU sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate. Per verificare se si tratta di una coltura mista, è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla a incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il risultati del TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA vengono interpretati in base a un valore soglia. I campioni che originano un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si colloca nell'area d'incertezza, il test deve essere ripetuto.

	AccuLDR (precedentemente PAL)	LEADER
Valore limite	1.500 PLU	50.000 RLU
Area d'incertezza	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es., *N. meningitidis*, ATCC #13077) e positivi (ad es., *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	LEADER
Controllo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controllo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato testato su colture fresche realizzate in terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. L'efficacia di questo test eseguito direttamente sui campioni clinici non è stata valutata.

I risultati del TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati di laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

Il TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura con identificazione biochimica. Questo studio è stato eseguito su tre centri clinici utilizzando 308 ceppi di *N. gonorrhoeae* e altri 239 ceppi batterici rappresentativi di 46 generi. I metodi di identificazione impiegati comprendevano l'esame al microscopio dopo colorazione di Gram, la ricerca di ossidasi come pure una serie di test di degradazione dei carboidrati ovvero uno dei metodi d'identificazione disponibili in commercio. I campioni sono stati indicati positivi (≥ 50.000 RLU) o negativi (< 50.000 RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi tra 200 e 41.219 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi tra 56.741 e 1.072.977 RLU. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali è riportato nella tabella che segue.

AccuPROBE / COLTURA						
AccuPROBE Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	149	0	0	124	100%/100%	100%
Centro 2	104	0	0	101	100%/100%	100%
Centro 3	55	0	0	14	100%/100%	100%
Totale	308	0	0	239	100%/100%	100%

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST AccuPROBE PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA è stata calcolata analizzando due diverse concentrazioni di RNA ribosomale di per 10 volte in una medesima serie.

Campione	A	B
Numero di Prove	10	10
Risposta Media	60.572	100.904
Scarto Tipo	1.030	2.502
Coefficiente di Variazione	1,7%	2,5%

B. PRECISIONE TRA-TEST

La precisione tra-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica le due stesse concentrazioni di RNA ribosomale di *N. gonorrhoeae* in 12 serie consecutive.

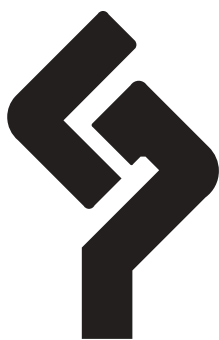
Campione	A	B
Numero di Prove	12	12
Risposta Media	55.825	97.168
Scarto Tipo	4.472	6.082
Coefficiente di Variazione	8,0%	6,3%

C. SPECIFICITÀ

Un totale di 155 colture di *N. gonorrhoeae* e altre 231 colture sono state studiate mediante il TEST ACCUProbe PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA. Questi ceppi rappresentavano un totale di 79 specie provenienti da 46 generi diversi. Cinquantasei ceppi di 11 specie di *Neisseria*, inclusi *N. lactamica* e *N. meningitidis*, nonché altre 67 specie provenienti da 45 generi rappresentativi di un'intersezione filogenetica sono stati analizzati mediante il TEST ACCUProbe PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA. Unicamente i ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* hanno evidenziato un risultato positivo.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Neisseria meningitidis è stata aggiunta a una concentrazione da 10 milioni di batteri per test a campioni contenenti da 1000 a 10 milioni di *N. gonorrhoeae*. Il TEST ACCUProbe PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA NEISSERIA GONORRHOEAE ISOLATA DA UNA COLTURA non ha evidenziato alcuna interferenza né reazione incrociata.





AccuProbe

NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

UTILIZAÇÃO

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *Neisseria gonorrhoeae* isolada de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização de ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

A gonorreia é a infecção bacteriana detectada com mais frequência nos Estados Unidos, com aproximadamente 767.000 casos diagnosticados em 1987. Esta doença sexualmente transmissível manifesta-se geralmente por uma uretrite anterior, acompanhada por exsudado purulento no homem. Na mulher, é geralmente o colo do útero que é atingido. As infecções são frequentemente assintomáticas. Portanto, se não forem tratadas, podem levar a graves complicações, por exemplo, a esterilidade. As infecções gonocócicas podem também ser diagnosticadas a partir de outras mucosas, particularmente a conjuntivite, o ânus e a orofaringe (8).

Neisseria gonorrhoeae é o agente responsável pelas gonorreias; é um diplococo Gram negativo, oxidase positiva, cujo crescimento requer condições estritas (3, 5, 7, 12, 14). O diagnóstico presuntivo baseia-se no isolamento do microrganismo a partir de uma cultura, no exame morfológico após coloração de Gram e na pesquisa do citocromo oxidase (3, 5, 9). A revelação através de anticorpos fluorescentes, a degradação dos hidratos de carbono, o estudo da fermentação dos glúcidos e os testes de aglutinação permitem confirmar o diagnóstico de uma infecção gonocócica (2, 4, 10, 11, 13).

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um método rápido e objectivo que permite a identificação de *Neisseria gonorrhoeae*, pela detecção de sequências de ARN ribossómico específicas.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicaenários estáveis (6). O método AccuPROBE utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar de ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARNr do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN-ARN estável. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não hibridizadas. O luminómetro GEN-PROBE permite medir o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar, é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são fornecidos em três embalagens distintas:

AccuPROBE SONDA PARA NEISSERIA GONORRHOEAE

Reagente Sonda (P) (2 x 10 tubos)
Neisseria gonorrhoeae

AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) 1 x 10 ml
Solução tampão que contém 0,04% de azida sódica

Reagente 2 (Tampão de Hibridização) (2) 1 x 10 ml
Solução tampão

Reagente 3 (Reagente de Selecção) (3) 1 x 60 ml
Solução tampão

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

Reagente de Detecção I (RI) 1 x 240 ml
0,1% de peróxido de hidrogéneo em 0,001 N de ácido nítrico

Reagente de Detecção II (RII) 1 x 240 ml
Hidróxido de sódio 1 N

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Unicamente para uso em diagnóstico *in vitro*.
- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (1).
- C. Utilizar unicamente para a identificação de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas de uma cultura.
- D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.
- E. Os reagentes desta embalagem contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas na canalização.
- F. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e com as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

Os tubos de Reagente Sonda devem ser conservados na saqueta/sachet de alumínio a 2° - 8°C. Antes da abertura, permanecem estáveis até à data de validade indicada. Depois da abertura, a saqueta/sachet deve ser bem fechada e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes de AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA podem ser conservados entre 2° e 25°C, e permanecem estáveis até à data de validade.

NÃO CONGELAR OS REAGENTES.

COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para identificar *Neisseria gonorrhoeae* isolado a partir de uma cultura.

- A. **Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado com culturas realizadas num meio sólido apropriado, quando se observar uma morfologia que sugere *Neisseria gonorrhoeae*. A amostra pode ser analisada logo que a proliferação seja visível e durante as 48 h seguintes.
1. A amostra de cultura pode ser colhida/coletada com uma ansa de plástico descartável de 1 µl, com uma ansa metálica ou com uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoa/swab uma vez que as bactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade mínima de líquido.
 2. É possível testar o conteúdo de uma ansa de 1 µl, várias colónias (3 ou 4) ou uma única colónia com um diâmetro de pelo menos 1 mm.
 3. Evitar colher/coletar parte do meio sólido de cultura.
 4. O bacteriologista pode, nesta etapa, decidir semear outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.

MATERIAL FORNECIDO

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
(bioMérieux ref. 39200 / Gen-Probe Cat. No. 2830)

Reagente Sonda (P)

20 Testes

2 x 10 tubos

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colheita/coleta das colónias.
Estirpes/cepas de controlo das culturas
Banho-maria ou bloco de aquecimento (60° ± 1°C)
Micropipetas (50 µl, 300 µl)
Pipetas de repetição (50 µl, 300 µl)
Vortex

MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 3100i)
Bloco de aquecimento GEN-PROBE (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)
AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 2800)
REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a 60° ± 1°C.
2. Preparar o luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de Reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar os testes.

B. CONTROLOS

As estirpes/cepas de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma estirpe/cepa de *Neisseria gonorrhoeae* (por exemplo, American Type Culture Collection, ATCC #19424) como controlo positivo e uma estirpe/cepa de *Neisseria meningitidis* (por exemplo, ATCC #13077) como controlo negativo.

C. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas/sachets de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes/cepas de controlo. Fechar bem a saqueta/sachet dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com um clip. Não retirar a saqueta/sachet que contém o dissecante.
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou estirpes/cepas de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 50 µl de Reagente 1 (Reagente de Lise) para os tubos de Reagente Sonda.
4. Transferir a amostra proveniente do meio sólido para os tubos de Reagente Sonda, seguindo as instruções do parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Agitar a ansa, agulha ou bastonete de madeira no Reagente 1 (Reagente de Lise) e misturar cuidadosamente para colocar as células em suspensão.

D. HIBRIDIZAÇÃO

1. Pipetar 50 µl de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para cada tubo de Reagente Sonda. Fechar os tubos e agitá-los manualmente ou utilizando um Vortex.
2. Incubar os tubos durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou num bloco de aquecimento.

E. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Retirar e conservar as tampas. Pipetar 300 µl de Reagente 3 (Reagente de Selecção) para cada tubo. Fechar novamente os tubos e agitá-los utilizando um Vortex para obter uma mistura homogénea.
2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 5 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ou em banho-maria ou num bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. Ler os resultados no luminómetro durante os 30 minutos seguintes.

F. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

- A. REAGENTES: O Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar. Aquecê-lo a $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ e agitá-lo para dissolver o precipitado.

- B. **TEMPERATURA:** A hibridização e a selecção são reacções termodependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. **DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES:** As reacções de hibridização e de selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de 6 minutos.
- D. **BANHO-MARIA:** A água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade de líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.
- E. **UTILIZAÇÃO DO VORTEX:** É essencial dispor de uma mistura homogénea durante a etapa de SELECÇÃO, especialmente após a adição do Reagente 3.
- F. **RESOLUÇÃO DE INCIDENTES:**
1. Podem observar-se valores de controlo negativo elevados (*Neisseria meningitidis*, ATCC #13077), superiores a 20.000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou a 600 PLU (Photometric Light Units) no AccuLDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes vários tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
 2. Podem observar-se valores de controlo positivo fracos (*Neisseria gonorrhoeae*, ATCC #19424) inferiores a 50.000 RLU no LEADER ou a 1.500 PLU no AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de microrganismos for insuficiente ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados de AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido.

	AccuLDR (anteriormente PAL)	LEADER
Valor limiar	1.500 PLU	50.000 RLU
Zona duvidosa	1.200-1.499 PLU	40.000-49.999 RLU

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos (por exemplo, *N. meningitidis*, ATCC #13077) e positivos (por exemplo, *N. gonorrhoeae*, ATCC #19424) devem estar dentro dos seguintes valores:

	AccuLDR (anteriormente PAL)	LEADER
Controlo negativo	< 600 PLU	< 20.000 RLU
Controlo positivo	> 1.500 PLU	> 50.000 RLU

LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os caldos de cultura citados no parágrafo COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. A eficácia deste teste, a partir das amostras clínicas não foi avaliada.

Os resultados de AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados conjuntamente com outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura, em três locais, utilizando 308 estirpes/cepas de *Neisseria gonorrhoeae* e 239 estirpes/cepas bacterianas provenientes de 46 géneros diferentes. Foi efectuada uma identificação pelos métodos tradicionais, incluindo a coloração de Gram, a detecção de oxidase, bem como uma série de testes de degradação dos hidratos de carbono ou outros métodos de identificação disponíveis no mercado. As estirpes/cepas foram divididas em duas categorias: positivas (≥ 50.000 RLU), ou negativas (< 50.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 200 e 41.219 RLU e as culturas positivas deram resultados compreendidos entre 56.741 e 1.072.977 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação apresenta-se de seguida:

AccuPROBE / IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

AccuPROBE Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	Taxa de concordância
Local 1	149	0	0	124	100%/100%	100%
Local 2	104	0	0	101	100%/100%	100%
Local 3	55	0	0	14	100%/100%	100%
Total	308	0	0	239	100%/100%	100%

COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio de AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *Neisseria gonorrhoeae*, 10 vezes numa mesma série.

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média	60.572	100.904
Desvio-padrão	1.030	2.502
Coeficiente de variação	1,7%	2,5%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *Neisseria gonorrhoeae*, 12 vezes numa mesma série.

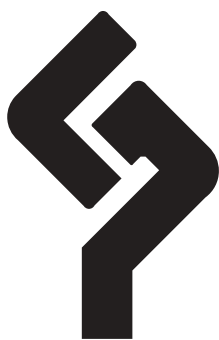
Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média	55.825	97.168
Desvio-padrão	4.472	6.082
Coeficiente de variação	8,0%	6,3%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 155 estirpes/cepas de *N. gonorrhoeae* e 231 de outras espécies bacterianas com AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes/cepas compreendiam 79 espécies provenientes de 46 géneros diferentes. Cinquenta e seis estirpes/cepas de 11 espécies de *Neisseria*, entre as quais *N. lactamica* e *N. meningitidis*, e 67 outras espécies provenientes de 45 géneros que representavam uma intersecção filogenética foram testadas com AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Apenas as estirpes/cepas de *Neisseria gonorrhoeae* deram resultados positivos.

D. TESTE DE SOBRECARGA

Foi adicionada *Neisseria meningitidis* a uma concentração de 10 milhões de bactérias por teste a amostras contendo entre 1.000 e 10 milhões de *N. gonorrhoeae*. Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada com AccuPROBE NEISSERIA GONORRHOEAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.



1. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
2. **Faur, Y.C., M.H. Weisburd, and M.E. Wilson.** 1975. Carbohydrate fermentation plate medium for IDENTIFICATION of neisseria species. J. Clin. Microbiol. **1**:294-297.
3. Guide for the diagnosis of gonorrhoea using culture and gram stained smear. 1985. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA 30333.
4. **Ison, C.A., K. McLean, J. Gedney, P.E. Munday, D. Cofhill, R. Smith, R.R.W. Harris, and C.S.F. Easmon.** 1985. Evaluation of a direct immunofluorescence test for diagnosing gonorrhoeae. J. Clin. Pathol. **38**:1142-1145.
5. **Kellogg, D.S., K.K. Holmes, and G.A. Hill.** 1976. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology: Laboratory diagnosis of gonorrhoea, p. 1-10. *In* S. Marcus and J.C. Sherris (ed.), Cumitech 4, American Society of Microbiology, Washington, D.C.
6. **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.
7. **Martin, J.E., and J.S. Lewis.** 1977. Improved mycotic activity in modified Thayer-Martin medium. The Public Health Laboratory **35**:53.
8. **McCormack, W.M.** 1981. Clinical spectrum of infection with neisseria gonorrhoeae. Sex. Trans. Dis. **8**:305-307.
9. **Morello, J.A., W.M. Janda, and M. Bohn Hoff.** 1985. Neisseria and branhamella, p. 176-192. *In* Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, H. J. Shadomy (ed.) Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. **Morse, S.A., S. Stein, and J. Hines.** 1974. Glucose metabolism in neisseria gonorrhoeae. J. Bacteriol. **120**:702-714.
11. **Reddick, A.** 1975. A simple carbohydrate fermentation test for identification of pathogenic neisseria. J. Clin. Microbiol. **2**:72-73.
12. **Sng, E.H., V.S. Rajan, K.L. Yeo, and A.J. Goh.** 1982. The recovery of neisseria gonorrhoeae from clinical specimens: Effects of different temperatures, transport time and media. Sex. Trans. Dis. **2**:74-78.
13. **Spengler, M.S., G.T. Rodeheaver, C. Richter, M.T. Edgerton, and R.F. Edlich.** 1978. The gram stain, the most important diagnostic test infection. J. Am. Coll. Emerg. Phys. **7**:434-438.
14. **Thayer, J.D., and J.E. Martin.** 1966. Improved medium selection for the cultivation of n. gonorrhoeae and n. meningitidis. Public Health Rep. **81**:559-562.



Gen-Probe Incorporated
San Diego, CA 92121 (USA)



EC	REP
-----------	------------

Authorized Representative
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH The Hague
The Netherlands

102846F-01 Rev. C 2011-03
©1989 - 2011 Gen-Probe Incorporated