



# *AccuProbe*

## **MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST**

(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

## **MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**

(bioMérieux Best.Nr. 39005 / Gen-Probe Kat. Nr. 102850/2850)

## **TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM GORDONAE ISOLE D'UNE CULTURE**

(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

## **TEST PARA LA IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM GORDONAE AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO**

(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

## **TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM GORDONAE ISOLATO DA CULTURA**

(bioMérieux cod. 39005 / Gen-Probe Cat. N. 102850/2850)

## **MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**

(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)



# AccuProbe

English

## MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### INTENDED USE

The AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is a rapid DNA probe test which utilizes the technique of nucleic acid hybridization for the identification of *Mycobacterium gordonae* isolated from culture.

### SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

*Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), a non-pathogenic scotochromogenic bacterium, is the third most commonly isolated *Mycobacterium* species in the United States (2). Scotochromogenic Mycobacteria accounted for approximately 19% of the clinical isolates reported to the Centers for Disease Control in 1980. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, and *M. flavescens* are all classified as scotochromogens (5). Of these, *M. scrofulaceum* and *M. xenopi* cause disease in humans. *M. xenopi* is easily distinguished from *M. gordonae* on the basis of standard biochemical tests; however, it is difficult to differentiate *M. scrofulaceum* from *M. gordonae*. *M. gordonae* comprises approximately 79% of the scotochromogenic Mycobacteria isolates whereas 11% are identified as *M. scrofulaceum*.

Classical methods for identification of mycobacteria rely on staining specimens for acid fast bacilli followed by culture and biochemical testing. It could take as long as two months to speciate an isolate using these standard methods (3).

The AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies *M. gordonae* isolated from culture in less than an hour.

### 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 (4). The AccuPROBE 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 the 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 AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

### AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE PROBE KIT

Probe Reagent (P)	(4 x 5 tubes)
<i>Mycobacterium gordonae</i> .	
Lysing Tubes (LT)	(1 x 20 tubes)
Glass beads and buffer.	

### 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 *M. gordonae* isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Culture handling and all procedural steps through the heat inactivation step should be performed in a Class II Biological Safety Cabinet.
- F. 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.
- G. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin, eyes and mucous membranes.  
**WARNING: CORROSIVE PRODUCT.** Wash with water if contact with these reagents occurs. 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° - 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 MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° - 25°C and are stable until the expiration date indicated.

### DO NOT FREEZE THE REAGENTS.

### SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

The AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *M. gordonae* isolated from culture.

- A. **Solid Media Method.** Growth from appropriate solid media, such as Lowenstein-Jensen slants or Middlebrook 7H10 or 7H11 plates, suggestive of *M. gordonae* may be tested. Samples may be tested as soon as growth is visible and during the subsequent sixty days of incubation.

1. Growth can be removed with a 1  $\mu$ L disposable plastic loop, a wire loop, or a disposable plastic needle. Swabs should not be used due to the small volume of liquid in which the cells are subsequently resuspended.
  2. Avoid taking any of the solid media with the cells.
  3. The operator may elect to inoculate another culture plate at this time to confirm the purity of the isolate.
- B. **Broth Culture Method.** Growth in Middlebrook 7H9 broth with turbidity equivalent to or greater than a McFarland 1 Nephelometer Standard may be tested with the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. Pipette a 100  $\mu$ L sample from the well-mixed broth suspension into the Lysing Reagent Tubes as described below.

### **MATERIALS PROVIDED**

The AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST (bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

#### **20 Tests**

Probe Reagent (P)	4 x 5 tubes
Lysing Reagent (LT)	1 x 20 tubes

### **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

1  $\mu$ L plastic sterile inoculating loops, wire loops, or plastic needles for selecting colonies  
 Control culture strains  
 Water bath or dry heat bath\* (60°  $\pm$  1°C)  
 Water bath or dry heat bath\* (95°  $\pm$  5°C)  
 Micropipettes (100  $\mu$ L, 300  $\mu$ L)  
 Re-pipettor (100  $\mu$ L, 300  $\mu$ L)  
 Vortex mixer  
 McFarland 1 Nephelometer Standard

\*Heating blocks in the dry heat bath should have wells that are correctly sized for 12 x 75 mm tubes. The use of GEN-PROBE dry heat baths is recommended.

### **AVAILABLE FROM YOUR GEN-PROBE DISTRIBUTOR**

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer  
 (bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)  
 GEN-PROBE Sonicator  
 (bioMérieux ref. 39409 / Gen-Probe Cat. No. 901104/T460)  
 AccuPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT  
 (bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)  
 GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT (1200 tests)  
 (bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)  
 Dry Heat Bath (60°  $\pm$  1°C)  
 (bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)  
 Dry Heat Bath (95°  $\pm$  1°C)  
 (bioMérieux ref. 39407 / Gen-Probe Cat. No. 3398)  
 Twin Dry Heat Bath (60°/95°  $\pm$  1°C)  
 (bioMérieux ref. 39408 / Gen-Probe Cat. No. 3399)  
 GEN-PROBE Sonicator Rack  
 (bioMérieux ref. 39313 / Gen-Probe Cat. No. 104027/4027)

## **TEST PROCEDURE**

### **A. EQUIPMENT PREPARATION**

1. For optimal transfer of sonic energy, water must be thoroughly degassed according to the following procedure:
  - a. Add enough hot water to fill the sonicator to within 1/2 inch of the top of the tank.
  - b. Run the sonicator for 15 minutes to thoroughly degas the water.
2. Adjust one heating block or water bath to  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and another heating block or water bath to  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .
3. 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 *M. gordonae* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #14470) may be used as the positive control while a culture of *M. scrofulaceum* (e.g., ATCC #19981) may be used as the negative control.

### **C. SAMPLE PREPARATION**

1. Label a sufficient number of Lysing Reagent Tubes to test the culture isolates and/or controls. Remove and retain the caps.
2. Pipette 100  $\mu\text{L}$  of Reagent 1 (Lysis Reagent) and 100  $\mu\text{L}$  of Reagent 2 (Hybridization Buffer) into all Lysing Reagent Tubes. **If broth cultures are to be tested, do not add Reagent 1 to the Lysing Reagent Tubes.**
3. Transfer the sample from the solid media or 100  $\mu\text{L}$  of a well mixed broth culture into the labeled Lysing Reagent Tubes as described in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. Twirl the loop, or needle in the Reagent 1 and Reagent 2 diluent mixture to remove the cells if testing growth from solid media.
4. Recap the Lysing Reagent Tubes and briefly Vortex.

### **D. SAMPLE LYSIS**

1. Push the Lysing Reagent Tubes through the Sonicator Rack so that the reaction mixture in the bottom of the tube is submerged but the caps are above the water. Place Sonicator Rack on water bath sonicator. **DO NOT ALLOW THE TUBES TO TOUCH THE BOTTOM OR SIDES OF THE SONICATOR.**
2. Sonicate for 15 minutes.
3. Place the Lysing Reagent Tubes, containing the sonicated organisms in a heating block or water bath for 10 minutes at  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .
4. Carefully remove the Lysing Reagent Tubes from the heating block or water bath.

### **E. HYBRIDIZATION**

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 100  $\mu\text{L}$  of the lysed specimens from the Lysing Reagent Tubes into the corresponding Probe Reagent Tubes.

- Recap the Probe Reagent Tubes and incubate for 15 minutes at  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a water bath or heating block.

#### F. SELECTION

- Remove the Probe Reagent Tubes from the water bath or heating block. Remove and retain the caps. Pipette 300  $\mu\text{L}$  of Reagent 3 (Selection Reagent) into each tube. Recap the tubes and Vortex them to mix completely.
- Incubate the Probe Reagent Tubes for 5 minutes at  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in a water bath or heating block.
- 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 1 hour after removing from the water bath or heating block.**

#### G. DETECTION

- Select the appropriate protocol from the menu of the luminometer software.
- 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.
- When the analysis is complete, remove the tube(s) from the luminometer.

#### **PROCEDURAL NOTES**

- REAGENTS:** Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at  $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$  will dissolve the precipitate.
- 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.
- 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.
- WATER BATH:** The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the Lysing Reagent Tubes are submerged up to, but not above, the level of the sealing ring. It should also be ensured that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged.
- VORTEXING:** It is critical to have a homogeneous mixture during the SAMPLE PREPARATION and SELECTION Steps, specifically after the addition of cells to Reagents 1 and 2 and after addition of Reagent 3.
- TROUBLE-SHOOTING:**
  - Elevated negative control values (*M. scrofulaceum* ATCC #19981) greater than 10,000 RLU (Relative Light Units) in the LEADER or 300 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) 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.
  - Low positive control values (*M. gordonae* ATCC #14470) less than 30,000 RLU in the LEADER or 900 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) can be caused by insufficient cell numbers, improper sonication 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 MYCOBACTERIUM GORDONAE 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.

	<b>AccuLDR</b> (formerly PAL)	<b>LEADER</b>
Cut-off value	900 PLU	30,000 RLU
Repeat range	600-899 PLU	20,000-29,999 RLU

### B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *M. scrofulaceum*, ATCC #19981) and positive control (e.g., *M. gordonae*, ATCC #14470) should satisfy the following values:

	<b>AccuLDR</b> (formerly PAL)	<b>LEADER</b>
Negative control	< 300 PLU	< 10,000 RLU
Positive control	> 900 PLU	> 30,000 RLU

## LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth cultures listed in the SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION Section. The efficacy of this test has not been demonstrated on direct clinical specimens (e.g., urine, stool or respiratory specimens).

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

## EXPECTED VALUES

The AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods at four sites using 255 isolates of *M. gordonae* and 308 isolates of 25 other *Mycobacterium* species. Standard culture identification is dependent on growth rate, colony morphology, microscopic examination and a series of biochemical reactions. The isolates were categorized as either positive ( $\geq 30,000$  RLU) or negative ( $< 30,000$  RLU). The range of observations for negative cultures was 138 to 21,710 RLU and 34,667 to 1,129,249 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

AccuPROBE Culture	AccuPROBE/CULTURE IDENTIFICATION				Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Site 1	86	0	1	69	98.9%/100%	99.4%
Site 2	15	0	1	97	93.8%/100%	99.1%
Site 3	101	1	1	98	99.0%/99.0%	99.0%
Site 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98.8%/99.7%</b>	<b>99.3%</b>

One of 7 *Mycobacterium asiaticum* isolates tested produced a false positive result. This isolate was negative upon repeat testing with the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE

IDENTIFICATION TEST. Three of 255 *M. gordonae* isolates tested produced a negative result using the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *M. gordonae* using 10 replicates in a single assay.

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	51,870	97,429
Standard Deviation	6,313	17,742
Coefficient of Variation	12.2%	18.2%

#### B. BETWEEN-RUN PRECISION

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

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	44,538	86,856
Standard Deviation	4,669	9,900
Coefficient of Variation	10.5%	11.4%

#### C. SPECIFICITY

A total of 122 ATCC culture isolates were evaluated using the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 99 species from 42 genera. Eight isolates of *M. gordonae*, 49 isolates of 27 other *Mycobacterium* species and 65 isolates of 41 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. All *M. gordonae* isolates tested in this study produced a positive result using the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Mycobacterium* species and the representative phylogenetic cross-section species did not react using this test.

#### D. RECOVERY

*Mycobacterium gordonae* ribosomal RNA at concentrations ranging from  $5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$  and  $1 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g}$  per test was assayed in the presence of 30 million cells of either *M. scrofulaceum*, *M. marinum* or *Nocardia asteroides*. No interference of *M. gordonae* signal was observed and the other organisms present did not react using the AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE CULTURE IDENTIFICATION TEST.



## MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST (bioMérieux Best.Nr. 39005 / Gen-Probe Kat. Nr. 102850/2850)

### VERWENDUNGSZWECK

Der AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist ein DNA-Sonden Schnelltest, der nach dem Prinzip der Nukleinsäurehybridisierung arbeitet und die Identifizierung von *Mycobacterium gordonae* aus Kulturisolaten ermöglicht.

### ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

*Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), ein apathogenes, scotochromogenes Bakterium, steht an dritter Stelle unter den in den Vereinigten Staaten am häufigsten isolierten Mykobakterien (2). Bei ca. 19% der klinischen Isolate, die 1980 dem Centers for Disease Control (CDC) gemeldet wurden, handelte es sich um scotochromogene Mykobakterien. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae* und *M. flavescens* werden alle als scotochromogen klassifiziert (5). Von diesen Stämmen sind *M. scrofulaceum* und *M. xenopi* humanpathogen. *M. xenopi* kann auf der Basis biochemischer Standardtests leicht von *M. gordonae* differenziert werden; dagegen ist es schwierig, *M. scrofulaceum* von *M. gordonae* zu unterscheiden. Bei ca. 79% der scotochromogenen Mykobakterien handelt es sich um *M. gordonae*, ca. 11% gehören zu *M. scrofulaceum*.

Die klassischen Methoden zur Identifizierung von Mykobakterien basieren auf der Säurefestigkeitsfärbung, gefolgt von Kulturansätzen und biochemischen Tests. Die Identifizierung eines Stammes kann unter diesen Umständen bis zu 2 Monate in Anspruch nehmen (3).

Der AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert *M. gordonae* aus Kulturisolaten innerhalb von 1 Stunde.

### PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (4). 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. Das 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 MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

## AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P)	(4 x 5 Röhrchen)
<i>Mycobacterium gordonae</i> .	
Lyseröhrchen (LT)	(1 x 20 Röhrchen)
Glaskügelchen und Puffer.	

## AccuPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENTIT

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 DETEKTIONS-REAGENZIENTIT

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

- Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- Beachten Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (1).
- Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *M. gordonae* aus der Kultur.
- Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- Die Bearbeitung der Kulturen und alle weiteren Schritte bis zur Hitzeinaktivierung sollten unter einer Laminar Flow Box erfolgen.
- 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.
- Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. **ACHTUNG: ÄTZENDE REAGENZIIEN.** Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten eines dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

## LAGERUNG

Die Sonden-Röhrchen 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 MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

## DIE REAGENZIIEN NICHT EINFRIEREN.

## PROBENGEWINNUNG UND-VORBEREITUNG

Der AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *M. gordonae* aus Kulturisolaten.

- Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Medien (z.B. Löwenstein Jensen-Schrägagar oder Middlebrook 7H10 oder 7H11 Platten) angezüchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um *M. gordonae* Bakterien handelt. Sie können die Kulturen testen, sobald Wachstum sichtbar wird oder während der folgenden 60-tägigen Inkubationszeit.

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 Mykobakterien anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
  2. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Kultur kein Nährboden mit abgenommen wird.
  3. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.
- B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit Middlebrook 7H9 Bouillonkulturen durchgeführt werden, deren Trübung gleich oder größer ist als McFarland Standard 1. Pipettieren Sie 100 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in ein Lyseröhrchen, wie im Abschnitt C der TESTDURCHFÜHRUNG beschrieben.

### **MITGELIEFERTER MATERIALIEN**

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST  
(bioMérieux Best.Nr. 39005 / Gen-Probe Kat. Nr. 102850/2850)

#### **20 Tests**

Sondenreagenz (P)	4 x 5 Röhrchen
Lyseröhrchen (LT)	1 x 20 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)  
Wasserbad oder Heizblock\* (95° ± 5°C)  
Mikropipetten (100 µl, 300 µl)  
Repetierpipetten (100 µl, 300 µl)  
Vortex  
McFarland Standard 1

\* Die Heizblöcke müssen für 12 x 75 mm Röhrchen geeignet sein. Es wird daher empfohlen, die Heizblocksysteme von GEN-PROBE zu verwenden.

### **ZUSÄTZLICH VERFÜGBARE MATERIALIEN**

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer  
(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100/3100i)  
GEN-PROBE Ultraschallbad  
(bioMérieux Best.Nr. 39409 / Gen-Probe Kat. Nr. 901104/T460)  
ACCUPROBE REAGENZIENTKIT FÜR DIE KULTURBESTÄTIGUNG  
(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)  
GEN-PROBE DETEKTIONS-REAGENZIENTKIT (1200 Tests)  
(bioMérieux Best.Nr. 39300 / Gen-Probe Kat. Nr. 201791/1791)  
Heizblock (60° ± 1°C)  
(bioMérieux Best.Nr. 39406 / Gen-Probe Kat. Nr. 3397)  
Heizblock (95° ± 1°C)  
(bioMérieux Best.Nr. 39407 / Gen-Probe Kat. Nr. 3398)  
Doppelheizblock (60°/95° ± 1°C)  
(bioMérieux Best.Nr. 39408 / Gen-Probe Kat. Nr. 3399)  
GEN-PROBE Röhrchenständer für das Ultraschallbad  
(bioMérieux Best.Nr. 39313 / Gen-Probe Kat. Nr. 104027/4027)

## TESTDURCHFÜHRUNG

### A. VORBEREITUNG DER GERÄTE UND MATERIALIEN

1. Für eine optimale Energieübertragung im Ultraschallbad muß das Wasser vor jedem Betrieb des Gerätes entgast werden:
  - a. Füllen Sie das Ultraschallbad bis ca. 1 cm unter den Rand mit heißem Wasser.
  - b. Schalten Sie das Ultraschallbad für 15 min ein.
2. Einen Heizblock oder ein Wasserbad auf  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  und einen weiteren Heizblock oder ein Wasserbad auf  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  einstellen.
3. Bereiten Sie das Gen-Probe LEADER Luminometer für die Messung vor. Vergewissern Sie sich, daß für die Durchführung des Tests ausreichend Detektionsreagenz I und II vorhanden ist.

### B. KONTROLLEN

In jedem Labor sollten gemäß den örtlichen Bestimmungen routinemäßig positive und negative Kontrollstämmen mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine *Mycobacterium gordonae* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 14470) dienen, während eine *Mycobacterium scrofulaceum* Kultur (z.B. ATCC 19981) als Negativkontrolle verwendet werden kann.

### C. PROBENVORBEREITUNG

1. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Lyseröhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
2. Pipettieren Sie 100 µl Reagenz 1 (Lysereagenz) und 100 µl Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) in alle Lyseröhrchen. **Geben Sie kein Reagenz 1 in die Lyseröhrchen, wenn Flüssigkulturen getestet werden.**
3. Überführen Sie die Probe vom festen Medium oder 100 µl einer gut gemischten Flüssigkultur in die beschrifteten Lyseröhrchen, wie im Abschnitt PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG beschrieben. Bei Proben von festen Kulturmedien wirbeln Sie die Öse oder Nadel in der Reagenzmischung, so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden.
4. Die Lyseröhrchen gut verschließen und kurz vortexen.

### D. LYSIEREN DER PROBEN

1. Die Lyseröhrchen in den Röhrchenständer des Ultraschallbads stellen, so daß das Reaktionsgemisch am Boden der Röhrchen ins Wasser eintaucht, die Deckel jedoch über dem Wasser sind. Stellen Sie den Röhrchenständer in das Ultraschallbad. **DIE RÖHRCHEN DÜRFEN DEN BODEN ODER DIE WÄNDE DES ULTRASCHALLBADS NICHT BERÜHREN.**
2. Schallen Sie die Probe für 15 min.
3. Anschließend werden die Lyseröhrchen mit den beschallten Mikroorganismen im Heizblock oder Wasserbad für 10 min bei  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  erhitzt.
4. Die Lyseröhrchen vorsichtig aus dem Heizblock oder Wasserbad nehmen.

### E. HYBRIDISIERUNG

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 Kulturproben und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 100  $\mu$ l der lysierten Proben aus den Lyseröhrchen in die entsprechenden Sondenröhrchen.
4. Verschließen Sie die Sondenröhrchen und inkubieren Sie diese für 15 min bei  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad oder Heizblock.

#### F. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenröhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300  $\mu$ l 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 dem Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen. **Die Röhrchen innerhalb der nächsten Stunde im Luminometer messen.**

#### G. 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 Angaben 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: Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Heizblock und das Wasserbad 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 die Röhrchen mit dem Lysereagenz bis zum Dichtungsring ins Wasser reichen, jedoch nicht darüber hinaus. Achten Sie darauf, daß sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenröhrchen im Wasser befindet.
- E. VORTEXEN: Während der Arbeitsschritte PROBENVORBEREITUNG und SELEKTION muß besonders darauf geachtet werden, daß die Probenmischung absolut homogen ist, insbesondere nach Zugabe der Mikroorganismen zu den Reagenzien 1 und 2 und nach Zugabe von Reagenz 3.

## F. FEHLERMÖGLICHKEITEN:

1. Bei Messungen mit dem LEADER können erhöhte negative Kontrollwerte (*M. scrofulaceum* ATCC 19981) über 10.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach der Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem AccuLDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 300 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.
2. Schwach positive Kontrollwerte (*M. gordonae* ATCC 14470) unter 30.000 RLU auf dem LEADER oder 900 PLU auf dem AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen, falscher Beschallung oder durch Testen von Mischkulturen oder 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 MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis der untenstehenden Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale diesen Grenzwerten entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Lichtsignale unterhalb dieser Grenzwerte werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden.

	<b>AccuLDR</b> (vormals PAL)	<b>LEADER</b>
Grenzwert	900 PLU	30.000 RLU
Graubereich	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

### B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die Negativkontrolle (z.B. *M. scrofulaceum* ATCC 19981) und die Positivkontrolle (z.B. *M. gordonae*, ATCC 14470) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	<b>AccuLDR</b> (vormals PAL)	<b>LEADER</b>
Negativkontrolle	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Positivkontrolle	> 900 PLU	> 30.000 RLU

## LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf festen Medien und in Flüssigkulturen, wie im Abschnitt PROBENENTNAHME UND-VORBEREITUNG beschrieben, angezüchtet wurden. Die Performance dieses Tests bei direkter Testung von klinischen Proben (z.B. Urin, Stuhl oder Proben aus dem Respirationstrakt) wurde nicht evaluiert.

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

## NORMALWERTE

Der AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 4 Labors mit klassischen Kulturverfahren und anschließender biochemischer Identifizierung verglichen. Hierfür wurden 255 *M. gordonae* Stämme und 308 Stämme von 25 anderen *Mycobacterium* Spezies getestet. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfassten die Wachstumsgeschwindigkeit, Kolonienmorphologie, mikroskopische Untersuchung und eine Reihe

biochemischer Tests. Die Stämme wurden entweder als positiv ( $\geq 30.000$  RLU) oder negativ ( $< 30.000$  RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 138 bis 21.710 RLU ermittelt, die Ergebnisse der positiven Kulturen lagen zwischen 34.667 und 1.129.249 RLU. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

AccuPROBE Kultur	AccuPROBE/KULTUR				Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrelation
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Labor 1	86	0	1	69	98,9%/100%	99,4%
Labor 2	15	0	1	97	93,8%/100%	99,1%
Labor 3	101	1	1	98	99,0%/99,0%	99,0%
Labor 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Gesamt</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98,8%/99,7%</b>	<b>99,3%</b>

Einer von 7 getesteten *Mycobacterium asiaticum* Stämme ergab ein falsch positives Ergebnis. Dieser Stamm reagierte bei der wiederholten Testung mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST negativ. 3 von 255 getesteten *M. gordonae* Stämmen reagierten mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST negativ.

## PERFORMANCE

### A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen der rRNA von *M. gordonae* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert	51.870	97.429
Standardabweichung	6.313	17.742
Variationskoeffizient	12,2%	18,2%

### B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen der *M. gordonae* rRNA in Einzelbestimmungen während 12 aufeinanderfolgender Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert	44.538	86.856
Standardabweichung	4.669	9.900
Variationskoeffizient	10,5%	11,4%

### C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 122 ATCC Referenzstämme mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 99 Spezies aus 42 Gattungen. 8 *M. gordonae* Stämme, 49 Stämme von 27 anderen *Mycobacterium* Spezies und 65 Stämme von 41 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Alle *Mycobacterium gordonae* Stämme, die in dieser Studie getestet wurden, reagierten mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM

GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv. Andere *Mycobacterium*-Spezies sowie die Spezies aus dem repräsentativen, phylogenetischen Querschnitt reagierten mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST negativ.

#### D. WIEDERFINDUNG

*M. gordonae* rRNA wurde in Konzentrationen von  $5 \times 10^{-4}$  µg bis  $1 \times 10^{-1}$  µg pro Test in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die entweder zu *M. scrofulaceum*, *M. marinum* oder *Nocardia asteroides* gehörten. Bei der Testung mit dem AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden keine Interferenzen oder Kreuzreaktionen festgestellt.



# AccuProbe

## TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM GORDONAE ISOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### UTILISATION

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN de *M. gordonae* isolé à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

### INTRODUCTION

*Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), bactérie scotochromogène non-pathogène, arrive au troisième rang des espèces de mycobactéries les plus fréquemment isolées aux États-Unis (2). Les mycobactéries scotochromogènes représentaient approximativement 19% des souches identifiées et signalées aux Centers for Disease Control en 1980. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, et *M. flavescens* sont toutes classées comme scotochromogènes (5). *M. scrofulaceum* et *M. xenopi* sont pathogènes pour l'homme. Les analyses biochimiques classiques permettent de différencier facilement *M. xenopi* et *M. gordonae*, alors qu'il est difficile de différencier *M. scrofulaceum* et *M. gordonae*. *M. gordonae* représente approximativement 79% des mycobactéries scotochromogènes isolées, alors que *M. scrofulaceum* n'en représente que 11%.

Les méthodes classiques d'identification des mycobactéries reposent sur la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants par coloration de Ziehl-Nielsen, suivie de la mise en culture et de l'analyse biochimique. Deux mois peuvent être nécessaires à l'identification d'une souche de mycobactérie en utilisant ces méthodes traditionnelles (3).

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE permet d'identifier *M. gordonae* en moins d'une heure.

### 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 (4). La méthode ACCUPROBE 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.

Français

## RÉACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

### COFFRET SONDE POUR *M. GORDONAE* AccuPROBE

Réactif Sonde (P) (4 x 5 tubes)

*M. gordonae*.

Tube de Lyse (LT) (1 x 20 tubes)

Billes de verre et tampon.

### COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE AccuPROBE

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) 1 x 10 ml

Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.

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

Solution tamponnée.

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

Solution tamponnée.

### COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml

0,1% d'eau oxygénée dans de l'acide nitrique 0,001 N.

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml

Hydroxide de sodium 1 N.

## PRÉCAUTIONS 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 *M. gordonae* isolé à partir d' une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. La manipulation des cultures et toutes les étapes du procédé jusqu'à l'étape d'inactivation par la chaleur doivent être effectuées dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe II.
- F. 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.
- G. Éviter tout contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses.  
**ATTENTION: PRODUIT CORROSIF.** En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

## CONSERVATION

Les tubes de Réactif de Sonde doivent être conservés dans les sachets 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 du TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* 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 ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE est conçu pour identifier *M. gordonae* isolé à partir d' une culture.

**A. Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, comme une gélose inclinée de Löwenstein-Jensen, ou un milieu de Middlebrook 7H10 ou 7H11, lorsqu'on observe une morphologie évocatrice de *M. gordonae*. L'échantillon peut être testé dès que la prolifération est visible et pendant les soixante jours d'incubation suivants.

1. L'échantillon de culture peut être prélevé à l'aide d'une ôse en plastique jetable de 1 µl, d'une ôse métallique, ou d'une aiguille en plastique jetable. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les mycobactéries vont être remises en suspension.
2. Eviter de prélever du milieu de culture avec les mycobactéries.
3. Le manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer un autre milieu de culture pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

**B. Identification sur bouillon de culture.** Le test peut être pratiqué sur des cultures en bouillon de Middlebrook 7H9 possédant une turbidité supérieure ou égale à 1 McFarland. Prélever à la pipette un échantillon de 100 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le distribuer dans le Tube de Lyse en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

### **MATÉRIEL FOURNI**

TEST ACCUProbe D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE  
(bioMérieux réf. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

#### **20 tests**

Réactif Sonde (P)	4 x 5 tubes
Tube de Lyse (LT)	1 x 20 tubes

### **MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI**

Ôses de 1 µl en plastique stérile, ôses métalliques, ou aiguilles en plastique pour prélever les colonies  
Souches de contrôle des cultures

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

Bain-marie ou bloc chauffant (95° ± 5°C)\*

Micropipettes (100 µl, 300 µl)

Pipettes répétitives (100 µl, 300 µl)

Vortex

Néphélomètre 1 McFarland

\* Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75mm. L'utilisation des blocs chauffants GEN-PROBE est recommandée.

## **MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR GEN-PROBE**

Luminomètre GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux réf. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)

Bloc chauffant (60° ± 1°C)

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

Bloc chauffant (95° ± 1°C)

(bioMérieux réf. 39407 / Gen-Probe Cat. No. 3398)

Bloc chauffant Twin (60°/95° ± 1°C)

(bioMérieux réf. 39408 / Gen-Probe Cat. No. 3399)

Sonicateur GEN-PROBE

(bioMérieux réf. 39409 / Gen-Probe Cat. No. 901104/T460)

Portoir de tubes pour le sonicateur GEN-PROBE

(bioMérieux réf. 39313 / Gen-Probe Cat. No. 104027/4027)

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES AccuPROBE

(bioMérieux réf. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

COFFRET DE REACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE (1200 tests)

(bioMérieux réf. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

### **MODE OPERATOIRE**

#### **A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL**

1. Remplir le réservoir du sonicateur d'eau chaude jusqu' à environ 1 cm du bord.
2. L'eau du bain à ultrasons doit être parfaitement dégazée avant la manipulation afin d'optimiser le transfert d'énergie des ultrasons. Pour dégazer l'eau entièrement, faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Régler un bloc chauffant ou un bain-marie à 60° ± 1°C et un autre bloc chauffant ou bain-marie à 95° ± 5°C.
4. Préparer le luminomètre Gen-Probe. S'assurer que la quantité de Réactifs de Détection I et II est suffisante 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. On peut utiliser une culture de *M. gordonae* (par ex. American Type Culture Collection, ATCC 14470) comme contrôle positif, et une culture de *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) comme contrôle négatif.

#### **C. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON**

1. Identifier un nombre suffisant de Tubes de Lyse pour tester les échantillons et/ou les souches de contrôle. Ôter et conserver les bouchons.
2. Transférer à la pipette 100 µl de Réactif 1 (Réactif de Lyse) et 100 µl de Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) dans tous les Tubes de Lyse. **Si le test est effectué sur des souches isolées à partir de bouillon de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les Tubes de Lyse.**
3. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 100 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les Tubes de Lyse, suivant les instructions données dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Si le test est réalisé sur une culture en milieu solide, agiter l'öse ou l'aiguille dans la solution pour remettre les cellules en suspension.
4. Reboucher les Tubes de Lyse et les agiter brièvement à l'aide d'un Vortex.

#### D. LYSÉ DE L'ÉCHANTILLON

1. Insérer les Tubes de Lyse dans le portoir du sonicateur de façon à ce que le mélange réactif au fond des tubes soit immergé, en maintenant les bouchons hors de l'eau. Mettre le portoir en place. **LES TUBES NE DOIVENT EN AUCUN CAS TOUCHER LE FOND OU LES PAROIS DU SONICATEUR.**
2. Faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Placer ensuite les tubes contenant les microorganismes lysés par sonication dans le bloc chauffant ou le bain-marie à  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes.
4. Retirer avec précaution les Tubes de Lyse du bloc chauffant ou du bain-marie.

#### E. HYBRIDATION

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. Prélever 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon lysé des Tubes de Lyse et les distribuer dans les tubes de Réactif Sonde correspondants.
4. Reboucher les tubes de Réactif Sonde et les mettre à incuber pendant 15 minutes à  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dans le bain-marie ou le bloc chauffant.

#### F. SÉLECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 300  $\mu\text{l}$  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 l'heure qui suit.**

#### G. DÉTECTION

1. Sélectionner le protocole approprié sur le luminomètre.
2. Afin de retirer 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  $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$  et l'agiter pour dissoudre le précipité.
- B. **TEMPÉRATURE:** l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent il est impératif de maintenir le bain-marie ou le bloc chauffant 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, faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant au moins 5 minutes mais pas plus de 6 minutes.
- D. BAIN-MARIE: le niveau d'eau doit être suffisamment élevé pour que les Tubes de Lyse soient immergés jusqu' à l'anneau de fermeture, mais pas au-dessus. S'assurer également que la totalité du liquide de réaction se trouvant dans les tubes de Réactif Sonde soit immergée.
- E. UTILISATION DU VORTEX: il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant les étapes de PRÉPARATION de L'ÉCHANTILLON et de SÉLECTION, particulièrement après l'addition des microorganismes aux Réactifs 1 et 2, et après addition du Réactif 3.
- F. RESOLUTION D'INCIDENTS:
1. Des valeurs élevées de contrôle négatif (*M. scrofulaceum*, ATCC 19981), supérieures à 10.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou à 300 PLU (Photometric Light Units) sur l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées soit lorsque l'homogénéisation a été insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit lorsque différents types de colonies sont présents. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.
  2. Des valeurs faibles de contrôle positif (*M. gordonae*, ATCC 14470), inférieures à 30.000 RLU au LEADER ou à 900 PLU à l'AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de germes est insuffisant, lorsque la sonication n'est pas correctement effectuée, ou lorsque le test est réalisé sur des cultures mixtes ou âgées. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

## RÉSULTATS

### A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* 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. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	<b>AccuLDR</b> (anciennement PAL)	<b>LEADER</b>
Valeur seuil	900 PLU	30.000 RLU
Zone d' incertitude	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

### B. CONTRÔLE DE QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *M. scrofulaceum*, ATCC 19981) et positifs (par ex. *M. gordonae*, ATCC 14470) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	<b>AccuLDR</b> (anciennement PAL)	<b>LEADER</b>
Contrôle négatif	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Contrôle positif	> 900 PLU	> 30.000 RLU

## LIMITES DU TEST

Cette méthode a été testée sur des cultures fraîches réalisées sur milieux solides et sur les types de bouillons de culture cités dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Les performances de ce test pratiqué directement sur des échantillons cliniques (prélèvements urinaires, coprologiques ou respiratoires) n'ont pas été évaluées.

Les résultats du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* 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 *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques d'identification biochimique sur quatre centres. Ont été testées: 255 souches de *M. gordonae* et 308 souches de 25 autres espèces de mycobactéries. Les méthodes classiques d'identification comprenaient l'observation du taux de croissance, l'étude de la morphologie des colonies, l'examen au microscope et une série de tests biochimiques. Les souches ont été déterminées soit positives ( $\geq 30.000$  RLU) soit négatives ( $< 30.000$  RLU). Les cultures négatives ont donné des résultats compris entre 138 et 21.710 RLU, les cultures positives des résultats compris entre 34.667 et 1.129.249 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure ci-dessous:

AccuPROBE Culture	AccuPROBE/CULTURE				Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég		
Site 1	86	0	1	69	98,9%/100%	99,4%
Site 2	15	0	1	97	93,8%/100%	99,1%
Site 3	101	1	1	98	99,0%/99,0%	99,0%
Site 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98,8%/99,7%</b>	<b>99,3%</b>

L'une des 7 souches de *M. asiaticum*, ayant donné un résultat faux-positif, a été retestée et a alors donné un résultat négatif. Parmi les 255 souches de *M. gordonae*, trois ont donné un résultat négatif avec le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE.

## PERFORMANCES DU TEST

### A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE a été calculée en analysant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *M. gordonae* 10 fois dans une même série.

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	51.870	97.429
Ecart-type	6.313	17.742
Coefficient de variation	12,2%	18,2%

## B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal de *M. gordonae*, au cours de 12 séries distinctes.

<b>Échantillon</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	44.538	86.856
Ecart-type	4.669	9.900
Coefficient de variation	10,5%	11,4%

## C. SPÉCIFICITÉ

Un total de 122 souches de cultures ATCC a été étudié à l'aide du TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE. Ces souches comprenaient 99 espèces issues de 42 genres différents. Un panel phylogénétique 8 souches de *M. gordonae*, 49 souches de 27 autres espèces de mycobactéries et 65 souches de 41 autres genres a été testé. Seules les souches de *M. gordonae* testées ont donné un résultat positif avec le TEST AccuPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. GORDONAE* ISOLE D'UNE CULTURE. Tous les autres microorganismes ont donné un résultat négatif.

## D. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions d'ARN ribosomal de *M. gordonae* dont les concentrations étaient comprises entre  $5 \times 10^{-4}$  µg et  $1 \times 10^{-1}$  µg par test ont été analysées en présence de 30 millions de microorganismes appartenant à l'une des espèces suivantes: *M. scrofulaceum*, *M. marinum* ou *Nocardia asteroides*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.



# AccuProbe

## TEST PARA LA IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM GORDONAE AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### UTILIZACION

EL TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO es un test rápido con sonda de ADN que utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de *Mycobacterium gordonae* aislado en cultivo.

### INTRODUCCION

*Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), bacteria escotocromógena no patógena, ocupa el tercer lugar entre las especies de micobacterias aisladas con más frecuencia en Estados Unidos (2). Las micobacterias escotocromógenas representan aproximadamente 19% de las cepas identificadas y señaladas en los Centros para el Control de Enfermedades en 1980. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae* y *M. flavescens* han sido todas clasificadas como escotocromógenas (5). *M. scrofulaceum* y *M. xenopi* son patógenas para el hombre. Los análisis bioquímicos clásicos permiten diferenciar fácilmente *M. xenopi* y *M. gordonae*, mientras que resulta difícil diferenciar *M. scrofulaceum* y *M. gordonae*. *M. gordonae* representa aproximadamente 79% de las micobacterias escotocromógenas aisladas, mientras que *M. scrofulaceum* representa apenas 11%.

Los métodos clásicos de identificación de las micobacterias se basan en la detección de bacilos ácido-alcohol-resistentes mediante tinción de Ziehl-Nielsen, seguida de la siembra en un medio de cultivo y del análisis bioquímico. Pueden ser necesarios dos meses para identificar una cepa de micobacterias utilizando estos métodos tradicionales (3).

EL TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO permite identificar *M. gordonae* en menos de una hora.

### PRINCIPIO

Los tests por hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos de aparearse de manera específica para formar complejos bicatenarios estables (4). El método ACCUPROBE utiliza una sonda ADN monocatenaria conjugada con un marcador quimioluminiscente complementario del ARN ribosómico (ARNr) del organismo diana. Cuando el ARNr del organismo diana es liberado, la sonda se hibrida con éste para formar un complejo ADN-ARN estable. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las sondas no hibridadas. 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 y es negativo si indica un valor inferior.

## REACTIVOS

Los reactivos utilizados en el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO son suministrados a partir de tres kits diferentes:

### KIT SONDA PARA *M. GORDONAE* AccuPROBE

Reactivo sonda (P)	(4 x 5 tubos)
<i>M. gordonae</i> .	
Tubo de lisis (LT)	(1 x 20 tubos)
Bolas de vidrio y tampón.	

### KIT DE REACTIVOS PARA IDENTIFICACION DE CULTIVO AccuPROBE

Reactivo 1 (Reactivo de lisis) (1)	1 x 10 ml
Solución tamponada que contiene 0,04% de azida sódica.	
Reactivo 2 (Tampón de hibridación) (2)	1 x 10 ml
Solución tamponada.	
Reactivo 3 (Reactivo de selección) (3)	1 x 60 ml
Solución tamponada.	

### KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

Reactivo de Detección I (RI)	1 x 240 ml
0,1% de agua oxigenada en ácido nítrico 0,001 N.	
Reactivo de Detección II (RII)	1 x 240 ml
Hidróxido de sodio 1 N.	

## PRECAUCIONES DE UTILIZACION

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Observar las precauciones habituales durante la realización de este test (1).
- C. Utilizar exclusivamente para la identificación de *M. gordonae* aislado a partir de un cultivo.
- D. Utilizar exclusivamente el material suministrado o material desechable.
- E. La manipulación de los cultivos y todas las etapas del procedimiento, hasta la etapa de inactivación mediante calor, deben ser realizadas en un Cabina de seguridad microbiológica de clase II.
- F. Los reactivos de este kit contienen azida sódica, susceptible de formar azidas metálicas explosivas por reacción con el plomo o el cobre de las cañerías. En el momento de eliminar estos reactivos, enjuagar con agua abundante para prevenir la formación de azidas en las cañerías.
- G. Evitar el contacto de los Agentes de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. **ATENCIÓN: PRODUCTO CORROSIVO.** Lavar con agua si se produce cualquier contacto con esos reactivos. Si se producen salpicaduras de estos reactivos, diluir con agua antes de secar.

## CONSERVACION

Los tubos del Reactivo sonda deben ser conservados en las bolsas de aluminio a 2° - 8°C. Antes de abrirlos son estables hasta la fecha de caducidad. Después de la apertura la bolsa debe ser cerrada herméticamente y los tubos deben ser utilizados en un plazo de dos meses, dentro del límite de la fecha de caducidad.

Los otros reactivos del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO pueden conservarse entre 2° y 25°C, y se mantienen estables hasta la fecha de caducidad.

## NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

## **TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA**

EL TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE M. GORDONAE AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO ha sido diseñado para la identificación de *M. gordonae* aislado a partir de un cultivo.

- A. Identificación a partir de un cultivo en medio sólido.** El test puede realizarse en cultivos en medio sólido adecuado, como agar inclinado de Löwenstein-Jensen, o un medio de Middlebrook 7H10 o 7H11, cuando se observa una morfología que permite sospechar la presencia de *M. gordonae*. La muestra puede ser estudiada apenas el crecimiento sea visible y durante los sesenta días de incubación que siguen.
1. La muestra de cultivo puede ser obtenida mediante un asa de plástico desechable de 1 µl, un asa metálica o una aguja de plástico desechable. No utilizar escobillón dada la escasa cantidad de líquido en la cual serán puestas en suspensión las micobacterias.
  2. Evitar que al extraer las micobacterias se extraiga medio de cultivo.
  3. El usuario puede en esta etapa decidir sembrar otro medio de cultivo para confirmar la pureza de la muestra aislada.
- B. Identificación en caldo de cultivo.** El test puede ser practicado en cultivo en caldo de Middlebrook. 7H9 con una turbidez superior o igual a 1 McFarland. Extraer con la pipeta una muestra de 100 µl de la suspensión del caldo perfectamente homogeneizada y distribuirla en el Tubo de Lisis, siguiendo las instrucciones del párrafo PREPARACION DE LA MUESTRA.

## **MATERIAL SUMINISTRADO**

TEST ACCUProbe DE IDENTIFICACION DE M. GORDONAE AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO (bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### **20 tests**

Reactivo sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de lisis (LT)	1 x 20 tubos

## **MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO**

Asas de 1 µl de plástico estéril, asas metálicas o agujas de plástico para extraer muestras de las colonias  
Cepas de control de los cultivos  
Baño maría o bloque térmico (60° ± 1°C)\*  
Baño maría o bloque térmico (95° ± 5°C)\*  
Micropipetas (100 µl, 300 µl)  
Pipetas repetitivas (100 µl, 300 µl)  
Vortex  
McFarland 1 estándar nefelométrico

\* Los emplazamientos al interior del bloque térmico deben estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda la utilización de bloques térmicos GEN-PROBE.

## **MATERIAL SUPLEMENTARIO DISPONIBLE EN SU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE**

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i  
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)  
Bloque térmico (60° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)  
Bloque térmico (95° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39407 / Gen-Probe Cat. No. 3398)  
Bloque térmico Twin (60°/95° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39408 / Gen-Probe Cat. No. 3399)

## Sonicador GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39409 / Gen-Probe Cat. No. 901104/T460)

## Porta-tubos para el sonicador GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39313 / Gen-Probe Cat. No. 104027/4027)

## EQUIPO DE REACTIVOS PARA IDENTIFICACION DE CULTIVOS ACCU<sub>PROBE</sub>

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

## EQUIPO DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE (1200 Tests)

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

### **TECNICA**

#### A. PREPARACION DEL MATERIAL

1. Llenar el depósito del sonicador con agua caliente hasta aproximadamente 1 cm del borde.
2. El agua del sonicador debe haber sido totalmente desgasificada antes de la manipulación con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos. Para desgasificar el agua por completo, hacer funcionar el aparato de ultrasonidos durante 15 minutos.
3. Regular un bloque térmico o un baño maría a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y otro bloque térmico o baño maría a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .
4. Preparar el luminómetro Gen-Probe. Verificar que la cantidad de Reactivos de detección I y II sea suficiente para realizar los tests.

#### B. CONTROLES

En cada laboratorio deben estudiarse cepas de control positivo y negativo rutinariamente, según la reglamentación vigente. Se puede utilizar un cultivo de *M. gordonae* (por ej., American Type Culture Collection, ATCC 14470) como control positivo, y un cultivo de *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) como control negativo.

#### C. PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Identificar un número suficiente de Tubos de lisis para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
2. Transferir con pipeta 100  $\mu\text{l}$  de Reactivo 1 (Reactivo de lisis) y 100  $\mu\text{l}$  de Reactivo 2 (Tampón de hibridación) a todos los Tubos de lisis. **Si el test se realiza en cepas aisladas a partir de un caldo de cultivo, no añadir Reactivo 1 en los Tubos de lisis.**
3. Transferir la muestra proveniente del medio sólido o 100  $\mu\text{l}$  del caldo de cultivo correctamente homogeneizado a los Tubos de lisis, siguiendo las instrucciones del párrafo OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Si el test se realiza en un cultivo en medio sólido, agitar el asa o la aguja en la solución para volver a poner en suspensión.
4. Volver a tapar los Tubos de lisis y agitarlos brevemente mediante un Vortex.

#### D. LISIS DE LA MUESTRA

1. Insertar los Tubos de lisis en el porta-tubos del sonicador de manera que la mezcla reactiva del fondo de los tubos se mantenga sumergida, manteniendo los tapones fuera del agua. Colocar el porta-tubos en su lugar. **LOS TUBOS NO DEBEN TOCAR JAMAS EL FONDO O LAS PAREDES DEL APARATO DE ULTRASONIDOS.**
2. Hacer funcionar el aparato de ultrasonidos durante 15 minutos.
3. Colocar a continuación los tubos que contienen los microorganismos lisados mediante ultrasonidos en el bloque térmico o en el baño maría a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

4. Retirar con precauciones los Tubos de lisis del bloque térmico o del baño maría.

#### E. HIBRIDACION

1. Cortar horizontalmente la parte superior de las bolsas de aluminio. Retirar el número necesario de tubos del Reactivo sonda para poder estudiar las muestras y/o las cepas de control. Cerrar la bolsa herméticamente doblando varias veces su extremo y fijándola con cinta adhesiva o con una pinza. **No retirar la bolsa desecante.**
2. Identificar un número suficiente de tubos del Reactivo sonda para analizar las muestras y/o cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
3. Extraer 100  $\mu\text{l}$  de muestra lisada de los Tubos de lisis y distribuirlos en los tubos de Reactivo sonda correspondientes.
4. Volver a tapar los tubos del Reactivo sonda y ponerlos a incubar durante 15 minutos a  $60^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  en el baño maría o en el bloque térmico.

#### F. SELECCION

1. Retirar los tubos del Reactivo sonda del baño maría o del bloque térmico. Retirar y conservar los tapones. Distribuir 300  $\mu\text{l}$  de Reactivo 3 (Reactivo de selección) en cada tubo. Volver a cerrar los tubos y agitarlos mediante un Vortex para mezclar completamente.
2. Incubar los tubos del Reactivo sonda durante 5 minutos a  $60^\circ \pm 1^\circ\text{C}$  al baño maría o en el bloque térmico.
3. Retirar los tubos del Reactivo sonda del baño maría o del bloque térmico y dejarlos a temperatura ambiente durante por lo menos 5 minutos. Retirar y conservar los tapones. **Leer los resultados mediante un luminómetro en la hora que sigue.**

#### G. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado en el luminómetro.
2. Con el fin de retirar cualquier residuo de la superficie de los tubos, enjuagar mediante un papel absorbente húmedo. Colocar a continuación los tubos en el luminómetro y seguir las instrucciones.
3. Cuando termina el análisis, retirar los tubos del luminómetro.

#### **OBSERVACIONES**

- A. REACTIVOS: el Reactivo 2 (Tampón de hibridación) puede precipitar. Calentarlo a  $35^\circ - 60^\circ\text{C}$  y agitarlos para disolver el precipitado.
- B. TEMPERATURA: la hibridación y la selección son reacciones termodependientes. En consecuencia, es imperativo mantener el baño maría o el bloque térmico a la temperatura especificada.
- C. DURACION DE LAS OPERACIONES: las reacciones de hibridación y de selección dependen del tiempo. La hibridación debe durar por lo menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCIÓN, incubar los tubos del Reactivo sonda durante al menos 5 minutos pero no más de 6 minutos.
- D. BAÑO MARIA: el nivel del agua debe ser suficientemente alto para que los Tubos de lisis queden sumergidos hasta el anillo de cierre, pero no por encima. Verificar igualmente que la totalidad del líquido de reacción que se encuentra en los tubos de Reactivo sonda quede sumergido.

- E. UTILIZACION DEL VORTEX: es esencial disponer de una mezcla homogénea durante las etapas de PREPARACION DE LA MUESTRA y de SELECCIÓN, particularmente después de añadir los microorganismos a los Reactivos 1 y 2, y después de añadir el Reactivo 3.
- F. RESOLUCION DE LOS INCIDENTES:
1. Valores elevados de control negativo (*M. scrofulaceum*, ATCC 19981), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units- Unidades de Luz Relativas) sobre el LEADER o a 300 PLU (Photometric Light Units-Unidades de Luz Fotométricas) en el AccuLDR (antiguamente PAL) pueden ser observadas ya sea cuando la homogeneización haya sido insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de selección), o bien cuando se encuentren presenten diferentes tipos de colonias. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede volver a sembrar una parte en un medio sólido apropiado y ponerla a incubar.
  2. Valores bajos de control positivo (*M. gordonae*, ATCC 14470), inferiores a 30.000 RLU al LEADER o a 900 PLU en el AccuLDR (antiguamente PAL) pueden ser observadas cuando el número de gérmenes es insuficiente, cuando el procesamiento en el aparato de ultrasonidos no ha sido correctamente efectuado o cuando el test ha sido realizado sobre cultivos mixtos o envejecidos. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede volver a sembrar una parte sobre un medio sólido apropiado, y ponerlo a incubar.

## **RESULTADOS**

### **A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS**

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO son interpretados en función de un valor umbral. Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual a este umbral son considerados como positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se encuentra situado en una zona dudosa, el test debe repetirse. Si el segundo análisis da nuevamente resultados dudosos, hay que volver a sembrar la cepa con el fin de verificar su pureza.

	<b>AccuLDR</b> (antiguamente PAL)	<b>LEADER</b>
Valor umbral	900 PLU	30.000 RLU
Zona de incertidumbre	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

### **B. CONTROL DE CALIDAD Y ACEPTABILIDAD DE LOS RESULTADOS**

Los controles negativos (p. ej., *M. scrofulaceum*, ATCC 19981) y positivos (p. ej., *M. gordonae*, ATCC 14470) deben satisfacer los siguientes valores:

	<b>AccuLDR</b> (antiguamente PAL)	<b>LEADER</b>
Control negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Control positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

### **LIMITES DEL TEST**

Este método ha sido analizado en cultivos frescos realizados en medio sólido y en los tipos de caldos de cultivo citados en el párrafo OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS. Los rendimientos de la prueba realizada directamente en muestras clínicas (muestras de orina, coprológicas o respiratorias) no han sido evaluados.

Los resultados del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO deben ser interpretados en función de los otros datos del laboratorio y puestos en correlación con los datos clínicos.

### **VALORES ESPERADOS**

El TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO ha sido comparado con los métodos clásicos de identificación bioquímica en cuatro centros. Fueron analizadas: 255 cepas de *M. gordonae* y 308 cepas de otras 25 especies de micobacterias. Los métodos clásicos de identificación incluyen la observación de la tasa de crecimiento, el estudio de la morfología de las colonias, el examen en microscopio y una serie de tests bioquímicos. Las cepas han sido determinadas ya sea como positivas ( $\geq 30.000$  RLU) o bien negativas ( $< 30.000$  RLU). Los cultivos negativos dieron resultados entre 138 y 21.710 RLU, los cultivos positivos, resultados entre 34.667 y 1.129.249 RLU. La comparación de estos resultados con los métodos clásicos de identificación figura a continuación:

AccuPROBE Cultivo	AccuPROBE/CULTIVO				Sensibilidad Especificidad	Porcentaje de Concordancia
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Sitio 1	86	0	1	69	98,9%/100%	99,4%
Sitio 2	15	0	1	97	93,8%/100%	99,1%
Sitio 3	101	1	1	98	99,0%/99,0%	99,0%
Sitio 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98,8%/99,7%</b>	<b>99,3%</b>

Una de las 7 cepas de *M. asiaticum*, que dio resultado falso positivo, fue analizada nuevamente y dio entonces un resultado negativo. Entre las 255 cepas de *M. gordonae*, tres dieron un resultado negativo con el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO.

### **RENDIMIENTOS DEL TEST**

#### **A. PRECISION INTRA-ENSAYO**

La precisión intra-ensayo del TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO fue calculada analizando dos concentraciones diferentes del ARN ribosómico de *M. gordonae* 10 veces en una misma serie.

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	51.870	97.429
Desviación típica	6.313	17.742
Coefficiente de variación	12,2%	18,2%

#### **B. PRECISION INTER-ENSAYOS**

La precisión inter-ensayo ha sido calculada analizando en simple dos concentraciones diferentes del ARN ribosómico de *M. gordonae*, durante 12 series diferentes.

Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	44.538	86.856
Desviación típica	4.669	9.900
Coefficiente de variación	10,5%	11,4%

### C. ESPECIFICIDAD

Un total de 122 cepas de cultivos ATCC fue estudiado mediante el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO. Estas cepas incluyen 99 especies provenientes de 42 géneros diferentes. Fue estudiado un panel filogenético de 8 cepas de *M. gordonae*, 49 cepas de otras 27 especies de micobacterias y 65 cepas de otros 41 géneros. Sólo las cepas de *M. gordonae* estudiadas dieron resultado positivo con el TEST AccuPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. GORDONAE* AISLADO A PARTIR DE UN CULTIVO. Todos los otros microorganismos dieron resultado negativo.

### D. TEST DE SOBRECARGA

Diluciones de ARN ribosómico de *M. gordonae* cuyas concentraciones se encontraban entre  $5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$  y  $1 \times 10^{-1} \mu\text{g}$  por test fueron analizadas en presencia de 30 millones de microorganismos pertenecientes a una de las siguientes especies: *M. scrofulaceum*, *M. marinum* o *Nocardia asteroides*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada.



# AccuProbe

## TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM GORDONAE ISOLATO DA COLTURA

(bioMérieux cod. 39005 / Gen-Probe Cat. N. 102850/2850)

### MODALITÀ D'IMPIEGO

Il test AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA è un test che fa uso di una sonda a DNA per l'identificazione rapida del *M. gordonae* isolato a partire da coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

### INTRODUZIONE

Il *Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), batterio scotocromogeno non patogeno, si trova al terzo posto fra le specie di micobatteri isolati con maggiore frequenza negli Stati Uniti (2). Nel 1980, i micobatteri scotocromogeni rappresentavano circa il 19% delle specie micobatteriche identificate e segnalate dai Centers for Disease Control. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae* e *M. flavescens* vengono classificati scotocromogeni (5). *M. scrofulaceum* e *M. xenopi* sono patogeni per l'uomo. Le analisi biochimiche tradizionali consentono di differenziare facilmente il *M. xenopi* e il *M. gordonae*, mentre risulta più difficile farlo con il *M. scrofulaceum* e il *M. gordonae*. Il *M. gordonae* rappresenta all'incirca il 79% dei micobatteri scotocromogeni isolati mentre il *M. scrofulaceum* rappresenta solamente l'11%.

Le metodiche tradizionali di identificazione dei micobatteri si basano sull'evidenziazione di bacilli alcool-acido resistenti mediante colorazione di Ziehl-Nielsen seguita dalla messa in coltura e dall'analisi biochimica. Ricorrendo a queste tecniche possono occorrere fino a due mesi per l'identificazione di un ceppo (3).

Il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA impiega meno di un'ora per tipizzare il *M. gordonae*.

### PRINCIPIO OPERATIVO

I test di ibridazione degli acidi nucleici sfruttano la capacità dei filamenti complementari di acidi nucleici di accoppiarsi in maniera specifica per formare complessi stabili a doppia catena (4). Il metodo AccuPROBE impiega una sonda a DNA a catena singola associata ad un marker chemiluminescente complementare all'RNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe formando così un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione consente di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro GEN-PROBE permette di individuare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indicherà un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostrerà un valore inferiore.

Italiano

## REAGENTI

I reagenti impiegati nel TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

### KIT SONDA PER IL M. GORDONAE AccuPROBE

Reagente Sonda (P) (4 x 5 provette)  
*M. gordonae*.  
Provette Lisi (LT) (1 x 20 provette)  
Sfere di vetro e tampone.

### KIT DI REAGENTI PER IDENTIFICAZIONE DI COLTURE 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 RIVELAZIONE 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. Adottare le normali precauzioni durante lo svolgimento di questo test (1).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione del *M. gordonae* isolato a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. La manipolazione delle colture e tutte le tappe del processo fino alla fase di inattivazione mediante calore devono essere effettuate in un ambiente dotato di livello di sicurezza microbiologica di classe II.
- F. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.
- G. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi o delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. **ATTENZIONE: PRODOTTO CORROSIVO.** In caso di contatto, lavare con acqua. Se si verificassero versamenti, diluirli con acqua prima di asciugare.

## CONSERVAZIONE

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

Gli altri reagenti del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA UNA COLTURA possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°c e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

### **NON CONGELARE I REAGENTI.**

#### **PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

Il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA è stato progettato e sviluppato per identificare il *M. gordonae* isolato a partire da una coltura.

**A. Identificazione a partire da coltura su terreno solido.** Il test può essere condotto su terreni solidi adeguati, come un terreno di coltura agar di Löwenstein Jensen o terreno di coltura di Middlebrook 7H10 o 7H11 quando si osserva una morfologia che può far pensare alla specie *M. gordonae*. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione e durante i successivi sessanta giorni di incubazione.

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 micobatteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi.
2. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i micobatteri.
3. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un altro mezzo di coltura per confermare la purezza del campione isolato.

**B. Identificazione da brodocoltura.** Il test può essere condotto su colture in brodo di Middlebrook 7H9 con una torbidità superiore o uguale a 1 McFarland. Prelevare con la pipetta 100 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella provetta di Lisi seguendo le istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

#### **MATERIALE COMPRESO NEL KIT**

TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA (bioMérieux cod. 39005 / Gen-Probe Cat. N. 102850/2850)

##### **20 test**

Reagente Sonda (P)	4 x 5 provette
Provetta Lisi (LT)	1 x 20 provette

#### **MATERIALE RICHiesto NON COMPRESO NEL KIT**

Anse da 1 µl in plastica sterile, anse metalliche, o aghi in plastica per il prelievo delle colonie  
Ceppi di controllo delle colture  
Bagnomaria o incubatore (60° ± 1°C)\*  
Bagnomaria o incubatore (95° ± 5°C)\*  
Micropipette (100 µl, 300 µl)  
Micropipette a volume fisso (100 µl, 300 µl)  
Vortex  
Nefelometro 1 McFarland

\* Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 x 75 mm. Si raccomanda l'impiego di incubatori GEN-PROBE.

## **ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE**

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux cod. 39400 / Gen-Probe Cat. N. 103100i/3100i)

Incubatore (60° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39406 / Gen-Probe Cat. N. 3397)

Incubatore (95° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39407 / Gen-Probe Cat. N. 3398)

Incubatore Twin (60°/95° ± 1°C)

(bioMérieux cod. 39408 / Gen-Probe Cat. N. 3399)

Sonicatore GEN-PROBE

(bioMérieux cod. 39409 / Gen-Probe Cat. N. 901104/T460)

Portaprovette per il sonicatore GEN-PROBE

(bioMérieux cod. 39313 / Gen-Probe Cat. N. 104027/4027)

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCU<sub>PROBE</sub>

(bioMérieux cod. 39305 / Gen-Probe Cat. N. 102800/2800)

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE (1200 test)

(bioMérieux cod. 39300 / Gen-Probe Cat. N. 201791/1791)

### **PROCEDIMENTO**

#### **A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE**

1. Riempire il serbatoio del sonicatore con acqua calda fino a circa 1 cm dal bordo.
2. L'acqua del bagno ad ultrasuoni deve essere perfettamente degassificata prima dell'uso per ottimizzare il trasferimento energetico degli ultrasuoni. Per degassificare completamente l'acqua far funzionare il sonicatore per 15 minuti.
3. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 60° ± 1°C e un altro incubatore o sistema a bagnomaria a 95° ± 5°C.
4. 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 occorre testare sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di *M. gordonae* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 14470) come controllo positivo ed una coltura di *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) come controllo negativo.

#### **C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE**

1. Predisporre un numero sufficiente di Provette di Lisi per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
2. Trasportare tramite pipetta 100 µl di Reagente 1 (Reagente di Lisi) e 100 µl di Reagente 2 (Tamponi di Ibridazione) in tutte le Provette di Lisi. **Se il test viene eseguito su ceppi isolati a partire da brodo di coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle Provette di Lisi.**
3. Trasportare il campione proveniente dal terreno di coltura solido o 100 µl del brodo di coltura correttamente omogeneizzato nelle Provette di Lisi, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito a partire da una coltura solida, agitare con un vortex l'ansa o l'ago nella soluzione per rimettere le cellule in sospensione.
4. Richiudere le Provette di Lisi e agitarle brevemente con un vortex.

#### D. LISI DEL CAMPIONE

1. Inserire le Provette di Lisi nel portaprovette affinché venga sommersa la miscela di reagente presente sul fondo, mantenendo i tappi fuori dall'acqua. Posizionare il portaprovette. **IN NESSUN CASO LE PROVETTE DEVONO TOCCARE IL FONDO O LE PARETI DEL SONICATORE.**
2. Far funzionare il sonicatore per 15 minuti.
3. Inserire successivamente le provette che contengono i microrganismi lisati mediante sonicazione nell'incubatore o a bagnomaria a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti.
4. Togliere con la massima prudenza le Provette di Lisi dall'incubatore o dal bagnomaria.

#### E. IBRIDAZIONE

1. Tagliare orizzontalmente la parte superiore delle confezioni di 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 fermanola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare la confezione di agenti essiccanti.**
2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o le colture di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
3. Prelevare 100  $\mu\text{l}$  di campione lisato dalle Provette di Lisi e dispensarli nelle rispettive provette di Reagente Sonda.
4. Richiudere le provette di Reagente Sonda e metterle ad incubare per 15 minuti a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a bagnomaria o in incubatore.

#### F. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300  $\mu\text{l}$  di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitarle con un vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 5 minuti a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a bagnomaria o in incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e buttare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

#### G. LETTURA

1. Selezionare il protocollo per la lettura 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 attentamente le istruzioni.
3. Una volta conclusa l'analisi, estrarre le provette dal luminometro.

#### OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a  $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$  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. DURATA DELLE OPERAZIONI: le reazioni di ibridazione e di selezione sono temperatura-dipendenti. L'ibridazione deve durare come minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 5 minuti senza superare però il limite dei 6 minuti.
- D. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che le provette di lisi siano sommerse fino all'anello di chiusura, ma non oltre. Assicurarsi inoltre 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 PREPARAZIONE del CAMPIONE e la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'inoculazione dei microrganismi ai Reagenti 1 e 2 e dopo l'aggiunta del Reagente 3.
- F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI:
1. Alti valori di controllo negativo (*M. scrofulaceum*, ATCC 19981), superiori a 10.000 RLU (Relative Light Units) sul LEADER o a 300 PLU (Photometric Light Units) sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'inoculazione del Reagente 3 (Reagente di Selezione), o quando siamo in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura e incubare.
  2. Bassi valori di controllo positivo (*M. gordonae*, ATCC 14470), inferiori a 30.000 RLU sul LEADER o a 900 PLU sull'AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente, quando la sonicazione non è stata correttamente eseguita o quando il test viene effettuato su colture miste o invecchiate. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura e incubare.

## RISULTATI DEL TEST

### A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL *M. GORDONAE* ISOLATO DA COLTURA vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che originano un segnale luminoso di valore superiore od uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi fa nuovamente emergere risultati equivoci, occorre trapiantare il ceppo per verificarne la purezza.

	<b>AccuLDR</b> (precedentemente PAL)	<b>LEADER</b>
Valore soglia	900 PLU	30.000 RLU
Area di incertezza	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

### B. CONTROLLO DI QUALITÀ E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *M. scrofulaceum*, ATCC 19981) e positivi (ad es. *M. gordonae*, ATCC 14470) devono soddisfare i seguenti valori:

	<b>AccuLDR</b> (precedentemente PAL)	<b>LEADER</b>
Controllo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controllo positivo	> 900 PLU	> 30.000 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. Le performance di questi test eseguiti direttamente sui campioni clinici (prelievi urinari, coprologici o respiratori) non sono state valutate.

I risultati del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA CULTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati del laboratorio e correlati ai dati clinici.

## VALORI ATTESI

Il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA CULTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di coltura con identificazione biochimica su quattro laboratori. Sono stati testati 255 stock-culture di *M. gordonae* e 308 stock-culture di altre 25 specie di micobatteri. Le metodiche tradizionali di identificazione comprendevano lo studio del tasso di accrescimento, l'analisi della morfologia delle colonie, l'esame microscopico e una serie di test biochimici. Il test ha permesso di classificare le colture positive ( $\geq 30.000$  RLU) e negative ( $< 30.000$  RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 138 e 21.710 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi fra 34.667 e 1.129.249 RLU. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato.

### AccuPROBE/COLTURA

AccuPROBE Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	86	0	1	69	98,9%/100%	99,4%
Centro 2	15	0	1	97	93,8%/100%	99,1%
Centro 3	101	1	1	98	99,0%/99,0%	99,0%
Centro 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Totale</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98,8%/99,7%</b>	<b>99,3%</b>

Uno dei 7 ceppi di *M. asiaticum* ha evidenziato un risultato falso positivo e quindi è stato nuovamente testato mostrando un risultato negativo. Fra i 255 stock-culture di *M. gordonae*, tre hanno evidenziato un risultato negativo con il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA CULTURA.

## PERFORMANCE DEL TEST

### A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA UNA CULTURA è stata calcolata analizzando due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *M. gordonae* per 10 volte in una medesima serie.

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	51.870	97.429
Deviazione standard	6.313	17.742
Coefficiente di variazione	12,2%	18,2%

## B. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisazione intra-test è stata calcolata analizzando con la modalità della determinazione unica due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *M. gordonae* in 12 serie differenti.

<b>Campione</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	44.538	86.856
Deviazione standard	4.669	9.900
Coefficiente di variazione	10,5%	11,4%

## C SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 122 colture ATCC tramite il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA. Questi ceppi comprendevano 99 specie provenienti da 42 generi diversi. È stato testato un panel filogenetico di 8 ceppi di *M. gordonae*, 49 ceppi di altre 27 specie di micobatteri e 65 ceppi di altri 41 generi. Unicamente i ceppi del *M. gordonae* hanno presentato un risultato positivo con il TEST AccuPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. GORDONAE ISOLATO DA COLTURA. Tutti gli altri microrganismi hanno evidenziato un risultato negativo.

## D. TEST DI SOVRACCARICO

Diluizioni di RNA ribosomiale di *M. gordonae* le cui concentrazioni erano comprese fra  $5 \times 10^{-4}$  µg e  $1 \times 10^{-1}$  µg per test sono state analizzate in presenza di 30 milioni di microrganismi appartenenti a una delle seguenti specie: *M. scrofulaceum*, *M. marinum* o *Nocardia asteroides*. Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata.



# AccuProbe

## MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### UTILIZAÇÃO

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *M. gordonae* isolado de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização de ácidos nucleicos.

### INTRODUÇÃO

*Mycobacterium gordonae* (*M. gordonae*), bactéria escotocromogénica não-patogénica, ocupa o terceiro lugar das espécies de micobactérias mais frequentemente isoladas nos Estados Unidos (2). Em 1980, as micobactérias scotocromogénicas representavam aproximadamente 19% das estirpes identificadas e registadas nos Centers for Disease Control. *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. gordonae* e *M. flavescens* são todas classificadas como escotocromogénicas (5). *M. scrofulaceum* e *M. xenopi* são patogénicos para o homem. Os testes bioquímicos clássicos permitem diferenciar facilmente *M. xenopi* e *M. gordonae*, enquanto que *M. scrofulaceum* e *M. gordonae* são difíceis de diferenciar. *M. gordonae* representa aproximadamente 79% das micobactérias escotocromogénicas isoladas, enquanto apenas 11% são identificadas como *M. scrofulaceum*.

Os métodos clássicos de identificação das micobactérias baseiam-se na detecção dos bacilos ácido-álcool-resistentes por coloração de Ziehl-Nielsen, seguida de cultura e testes bioquímicos. Podem ser necessários dois meses para identificar uma estirpe utilizando estes métodos tradicionais (3).

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA permite identificar *M. gordonae* em menos de uma hora.

### 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 bicatenários estáveis (4). O método ACCUPROBE utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar do ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Após libertação do ARNr do organismo alvo, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN-ARN estável. O Reagente de Seleção 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 o AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são fornecidos em três embalagem distintas:

### SONDA AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE

Reagente Sonda (P) (4 x 5 tubos)

*Mycobacterium gordonae*.

Tubo de Lise (LT) (1 x 20 tubos)

Esferas de vidro e tampão.

### AccuPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

Reagente 1 (Reagente de Lise) (1) 1 x 10 ml

Solução tampão contendo 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 hidrogénio em ácido nítrico 0,001 N.

Reagente de Detecção II (RII) 1 x 240 ml

Hidróxido de sódio 1 N.

### PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Unicamente para diagnóstico *in vitro*.
- B. Observar as precauções habituais quando efectuar este teste (1).
- C. Utilizar unicamente para a identificação de *M. gordonae* isolado de cultura.
- D. Utilizar unicamente o material fornecido ou material de utilização única.
- E. A manipulação das culturas e todas as etapas do procedimento até à etapa de inactivação pelo calor devem ser efectuadas num local de segurança microbiológica de classe II.
- F. Os reagentes deste kit 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.
- G. Evitar qualquer contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele, os olhos e as mucosas. **ATENÇÃO: PRODUTO CORROSIVO.** Em 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 nas saquetas de alumínio a 2° - 8° C. Antes da abertura permanecem estáveis até à data de validade indicada. Após a abertura, a saqueta deve ser fechada hermeticamente e os tubos devem ser utilizados no prazo de dois meses, dentro da validade.

Os outros reagentes de MYCOBACTERIUM GORDONAE 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 E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para a identificação de *M. gordonae* isolado de uma cultura.

- A. Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado com culturas realizadas num meio sólido apropriado, como uma gelose inclinada de Löwenstein-Jensen, ou em meios de Middlebrook 7H10 ou 7H11, quando se observa uma morfologia que evoca o *M. gordonae*. A amostra pode ser analisada logo que o crescimento seja visível e durante os 60 dias de incubação seguintes.
1. A amostra de cultura pode ser colhida com uma ansa de plástico descartável de 1 µl, com uma ansa metálica ou com uma agulha de plástico descartável. Não utilizar zaragatoa visto que as micobactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade de líquido mínima.
  2. Evitar colher parte do meio sólido de cultura juntamente com as micobactérias.
  3. O bacteriologista pode, nesta etapa, decidir semear um outro meio de cultura para confirmar a pureza da amostra isolada.
- B. Identificação a partir de caldo de cultura.** O teste pode ser efectuado em culturas de caldo de Middlebrook 7H9 com uma turvação superior ou igual a 1 McFarland. Colher com a pipeta uma amostra de 100 µl da suspensão do caldo devidamente homogeneizado, e distribuí-la no Tubo de Lise, seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

## **MATERIAL FORNECIDO**

AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA (bioMérieux ref. 39005 / Gen-Probe Cat. No. 102850/2850)

### **20 testes**

Reagente Sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de Lise (LT)	1 x 20 tubos

## **MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO**

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colheita das colónias  
Estirpes de controlo das culturas  
Banho-maria ou bloco de aquecimento (60° ± 1°C)\*  
Banho-maria ou bloco de aquecimento (95° ± 5°C)\*  
Micropipetas (100 µl, 300 µl)  
Pipetas de repetição (100 µl, 300 µl)  
Vortex  
Padrão de nefelometria McFarland 1

\* Os orifícios do bloco de aquecimento devem estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Aconselha-se a utilização dos blocos de aquecimento GEN-PROBE.

## **MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE**

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i  
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)  
Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)  
Bloco de aquecimento (95° ± 1°C)  
(bioMérieux ref. 39407 / Gen-Probe Cat. No. 3398)

Bloco de aquecimento Twin ( $60^{\circ}/95^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )

(bioMérieux ref. 39408 / Gen-Probe Cat. No. 3399)

Sonicador GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39409 / Gen-Probe Cat. No. 901104/T460)

Suporte de tubos para o sonicador GEN-PROBE

(bioMérieux ref. 39313 / Gen-Probe Cat. No. 104027/4027)

AccuPROBE KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS

(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)

KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE (1200 testes)

(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

## **PROCEDIMENTO**

### **A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL**

1. Encher o reservatório do sonicador com água quente até cerca de 1 cm do bordo.
2. A água do banho de ultra-sons deve estar perfeitamente desgaseificada antes da manipulação para otimizar a transferência de energia dos ultra-sons. Para desgaseificar completamente a água, colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e um outro bloco de aquecimento ou banho-maria a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ .
4. 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 de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *M. gordonae* (por ex. American Type Culture Collection, ATCC 14470) como controlo positivo e uma cultura de *M. scrofulaceum* (ATCC 19981) como controlo negativo.

### **C. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA**

1. Identificar um número suficiente de Tubos de Lise para testar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
2. Pipetar 100  $\mu\text{l}$  de Reagente 1 (Reagente de Lise) e 100  $\mu\text{l}$  de Reagente 2 (Tampão de Hibridização) para todos os Tubos de Lise. **Se o teste for efectuado com estirpes isoladas a partir de caldo de cultura, não adicionar Reagente 1 aos Tubos de Lise.**
3. Transferir a amostra proveniente do meio sólido ou 100  $\mu\text{l}$  do caldo de cultura correctamente homogeneizado para os Tubos de Lise, seguindo as instruções descritas em COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou agulha na solução para colocar as células em suspensão.
4. Fechar os Tubos de Lise e agitá-los ligeiramente num Vortex.

### **D. LISE DA AMOSTRA**

1. Inserir os Tubos de Lise no suporte do sonicador de forma a que a mistura de reagente no fundo dos tubos fique imersa, mantendo as tampas fora de água. Colocar o suporte no local. OS TUBOS NÃO DEVEM, EM CASO ALGUM, TOCAR NO FUNDO OU NAS PAREDES DO SONICADOR.

2. Colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Em seguida, colocar os tubos que contém os microrganismos lisados por sonicação no bloco de aquecimento ou banho- maria a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$  durante 10 minutos.
4. Retirar cuidadosamente os Tubos de Lise do bloco de aquecimento ou do banho-maria.

#### E. HIBRIDIZAÇÃO

1. Cortar horizontalmente a parte superior das saquetas de alumínio. Retirar o número necessário de tubos de Reagente Sonda para analisar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Fechar a saqueta hermeticamente dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com uma pinça. **Não retirar a saqueta que contém o dessecante.**
2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Retirar 100  $\mu\text{l}$  de amostra lisada dos Tubos de Lise para os tubos de Reagente Sonda correspondentes.
4. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los a incubar durante 15 minutos a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  num banho-maria ou bloco de aquecimento.

#### F. SELECÇÃO

1. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento. Tirar e conservar as tampas. Distribuir 300  $\mu\text{l}$  de Reagente 3 (Reagente de Selecção) em cada tubo. Voltar a tapar os tubos e agitá-los num Vortex para obter uma mistura homogénea.
2. Incubar os tubos de Reagente Sonda durante 5 minutos a  $60^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  em banho-maria ou 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 a hora seguinte.**

#### G. 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 de acordo com as instruções do aparelho.
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 termo-dependentes. 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 chegar ao nível do anel de fecho dos Tubos de Lise, mas não acima. Certificar-se de que a totalidade do líquido reaccional dos tubos de Reagente Sonda está bem imersa.
- E. UTILIZAÇÃO DO VORTEX: é essencial dispor de uma mistura homogénea durante as etapas de PREPARAÇÃO da AMOSTRA e de SELECÇÃO, especialmente após a adição dos microrganismos aos Reagentes 1 e 2, e após a adição do Reagente 3.
- F. RESOLUÇÃO DE INCIDENTES:
1. Podem observar-se valores elevados de controlo negativo (*M. scrofulaceum*, ATCC 19981), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou a 300 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 diversos 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 baixos de controlo positivo (*M. gordonae*, ATCC 14470), inferiores a 30.000 RLU no LEADER ou a 900 PLU no AccuLDR (anteriormente PAL) se o número de germes for insuficiente, se a sonicação não tiver sido correctamente efectuada 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 do AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE 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. Se a segunda análise der também um resultado equívoco, é necessário repicar a estirpe para verificar a sua pureza.

	<b>AccuLDR</b> (anteriormente PAL)	<b>LEADER</b>
Valor limiar	900 PLU	30.000 RLU
Zona duvidosa	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

### B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os controlos negativos (por ex. *M. scrofulaceum*, ATCC 19981) e positivos (por ex. *M. gordonae*, ATCC 14470) devem estar de acordo com os seguintes valores:

	<b>AccuLDR</b> (anteriormente PAL)	<b>LEADER</b>
Controlo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controlo positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

### LIMITES DO TESTE

Este método foi testado com culturas frescas efectuadas em meios sólidos e com os tipos de caldos de cultura citados em COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. As performances deste teste, utilizado directamente a partir de amostras clínicas (urinárias, coprológicas ou respiratórias) não foram avaliadas.

Os resultados de AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados em função de outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

### **VALORES ESPERADOS**

AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com os métodos clássicos de identificação de cultura em quatro locais diferentes. Foram testadas 255 estirpes de *M. gordonae* e 308 estirpes de 25 outras espécies de micobactérias. Os métodos clássicos de identificação compreendiam a taxa de crescimento, a morfologia das colônias, o exame microscópico e testes bioquímicos. As estirpes foram classificadas como positivas ( $\geq 30.000$  RLU) ou negativas ( $< 30.000$  RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 138 e 21.710 RLU e as culturas positivas entre 34.667 e 1.129.249 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação é apresentada a seguir:

AccuPROBE Cultura	AccuPROBE/CULTURA				Sensibilidade/ Especificidade	% de Concordância
	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg		
Local 1	86	0	1	69	98,9%/100%	99,4%
Local 2	15	0	1	97	93,8%/100%	99,1%
Local 3	101	1	1	98	99,0%/99,0%	99,0%
Local 4	50	0	0	46	100%/100%	100%
<b>Total</b>	<b>252</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>310</b>	<b>98,8%/99,7%</b>	<b>99,3%</b>

Uma das 7 estirpes de *M. asiaticum*, tendo dado um resultado falso-positivo, foi novamente testada e deu um resultado negativo. Entre as 255 estirpes de *M. gordonae*, três deram um resultado negativo com AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.

### **PERFORMANCES DO TESTE**

#### **A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO**

A precisão intra-ensaio de AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada testando duas concentrações diferentes de ARN ribossômico de *M. gordonae*, 10 vezes numa mesma série.

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	51.870	97.429
Desvio-padrão	6.313	17.742
Coefficiente de variação	12,2%	18,2%

#### **B. PRECISÃO INTER-ENSAIO**

A precisão inter-ensaio foi calculada testando singularmente duas concentrações diferentes de ARN ribossômico de *M. gordonae*, em 12 séries distintas.

Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	44.538	86.856
Desvio-padrão	4.669	9.900
Coefficiente de variação	10,5%	11,4%

### C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 122 estirpes ATCC com AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes correspondiam a 99 espécies de 42 géneros. Foi analisado um painel filogenético de 8 estirpes de *M. gordonae*, 49 estirpes de 27 outras espécies de *Mycobacterium* e 65 estirpes de 41 outros géneros. Todas as estirpes de *M. gordonae*, e unicamente essas, deram um resultado positivo com AccuPROBE MYCOBACTERIUM GORDONAE TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Todos os outros microrganismos deram um resultado negativo.

### D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas diluições de ARN ribossómico de *M. gordonae* com concentrações compreendidas entre  $5 \times 10^{-4}$  µg e  $1 \times 10^{-1}$  µg por teste, na presença de 30 milhões de microrganismos pertencentes a uma das espécies seguintes: *M. scrofulaceum*, *M. marinum* ou *Nocardia asteroides*. Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada.

1. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
2. **Good, R.C., and D.E. Snider Jr.** 1982. Isolation of Nontuberculous Mycobacteria in the United States. 1980. J. Infect. Dis. **146**:829-833.
3. **Kent, P. T., and G. P. Kubica.** 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U. S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta.
4. **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.
5. **Sommers, H.M., and R.C. Good.** 1985. *Mycobacterium*, p. 216-248. In Lennette, E.H., A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and H.J. Shadomy, (ed.) Manual of clinical microbiology, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Mfd. by  
**Gen-Probe Incorporated**  
**San Diego, CA 92121 (USA)**



<b>EC</b>	<b>REP</b>
-----------	------------

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

102898F-01 Rev. C 2011-03  
©1990 - 2011 Gen-Probe Incorporated