



AccuProbe®

MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST

(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best. Nr. 39002 / Gen-Probe Kat. Nr. 102835/2835)

**TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM AVIUM
ISOLE PAR CULTURE**

(bioMérieux réf. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

**TEST DE IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM AVIUM
AISLADO EN UN CULTIVO**

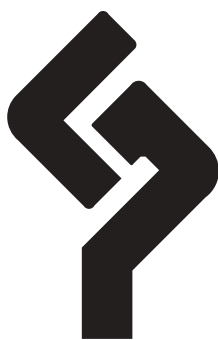
(bioMérieux réf. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

**TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM AVIUM
ISOLATO A PARTIRE DA UNA COLTURA**

(bioMérieux cod. 39002 / Gen-Probe N. 102835/2835)

**MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE
IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA**

(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)





AccuProbe

MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

INTENDED USE

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

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Mycobacterium avium (*M. avium*) is a member of the *Mycobacterium avium* complex (*M. avium* complex) which consists of a number of organisms whose taxonomic relationships are both unclear and controversial, but whose pathogenicity in man is unquestioned (16). *M. avium* has been shown to cause significant disease in immunocompromised patients (12). Treatment of this infection is difficult and the severity of the infection requires rapid diagnosis. Additionally in some laboratories the incidence of *M. avium* complex is equal to or greater than the incidence of *M. tuberculosis*.

Classical methods for identification of mycobacteria rely on staining specimens for acid fast bacilli followed by culture and subsequent biochemical testing. It can take as long as two months to speciate a *Mycobacterium* isolate using these standard culture methods (8).

M. avium complex is generally thought to consist of two species: *M. avium* and *M. intracellulare*. Phenotypically *M. avium* and *M. intracellulare* are virtually indistinguishable and biochemical tests are unable to differentiate between them.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has been useful in the identification of *M. avium* and *M. intracellulare* (3), however, it is time consuming and not readily available to most clinical laboratories.

Serology has also been used for the differentiation of *M. avium* and *M. intracellulare* strains, using α -antigen sera and may be useful in epidemiological studies. However, serotyping is not generally available and is of limited use in patient management. Currently there are 28 serovars generally accepted within the *M. avium* complex and at various times different serotypes have been assigned to the individual species *M. avium* and *M. intracellulare*. Historically serovars 1 through 3 were considered *M. avium*, while serovars 4 through 28 were considered *M. intracellulare* (15).

In several studies, Baess utilized DNA:DNA hybridization to clarify the taxonomic relationships between these

two species. Based upon her analyses, she concluded that serovars 4, 5, 6, and 8, which at that time had been classified as *M. intracellulare*, actually belonged to the species *M. avium*. The status of serovar 9 was unclear (1, 2).

Saito, *et al*, also utilized DNA probe technology and has proposed reassigning the 28 serovars as follows: serovars 1 through 6, 8 through 11, and 21 to *M. avium*; serovars 7, 12 through 20, and 25 to *M. intracellulare*, serovars 22 through 28 (except for serovar 25) were considered to be heterogeneous and could not be assigned to either species (13). In addition, some strains could not be serotyped, and a few agglutinated in more than one antisera.

Other reports utilizing DNA probes for speciating within the *Mycobacterium avium* complex have also been published, including the use of DNA probes for epidemiological studies and the geographical distribution of *M. avium* and *M. intracellulare* (5-7, 9, 11, 14).

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies *M. avium* isolated from culture in less than one hour of sample preparation. Identification is based upon the detection of specific ribosomal RNA sequences that are unique to *M. avium*. The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST offers a rapid, non-subjective and accurate means of identifying *M. avium* isolated from culture.

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 (10). 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 AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM PROBE KIT

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

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

<u>Reagent 1</u> (Lysis Reagent) (1) buffered solution containing 0.04% sodium azide.	1 x 10 mL
<u>Reagent 2</u> (Hybridization Buffer) (2) buffered solution.	1 x 10 mL
<u>Reagent 3</u> (Selection Reagent) (3) buffered solution	1 x 60 mL

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

<u>Detection Reagent I (RI)</u>	1 x 240 mL
0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N nitric acid.	
<u>Detection Reagent II (RII)</u>	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 (4).
- C. Use only for the identification of *M. avium* isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified 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. 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° to 8°C. The Probe Reagent Tubes are stable in the unopened pouches until the expiration date indicated. Once opened, the pouch should be resealed and the tubes should be used within two months and prior to the expiration date.

Other reagents used in the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST may be stored between 2° and 25°C and are stable until the expiration date indicated.

DO NOT FREEZE THE REAGENTS.**SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *Mycobacterium avium* 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. avium* 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 µL 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 AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST. Pipette a 100 µL sample from the well mixed broth suspension into the Lysing Tube as described below.

MATERIALS PROVIDED

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST
(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

20 Tests

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

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1 µL plastic sterile inoculating loops, wire loops, or plastic needles for selecting colonies.

Control culture strains

Water bath or dry heat bath* (60° ± 1°C)

Water bath or dry heat bath* (95° ± 5°C)

Micropipettes (100 µL, 300 µL)

Re-pipettor (100 µL, 300 µL)

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

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

Dry Heat Bath (60° ± 1°C)

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

Dry Heat Bath (95° ± 1°C)

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

Twin Dry Heat Bath (60°/95° ± 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 bath to within 1 cm 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. avium* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #25291) may be used as the positive control while a culture of *M. intracellulare* (e.g., ATCC #13950) 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 μL of Reagent 1 (Lysis Reagent) and 100 μL 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 μL 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 μL of the lysed specimens from the Lysing Reagent Tubes into the corresponding Probe Reagent Tubes.
4. 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

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

G. DETECTION

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

PROCEDURAL NOTES

- A. REAGENTS: Reagent 2 (Hybridization Buffer) may precipitate. Warming and mixing the solution at 35° to 60°C will dissolve the precipitates.
- B. TEMPERATURE: The Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the water bath or heating block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME: The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 5 minutes but no more than 6 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the 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.
- E. VORTEXING: It is critical to have a homogenous 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.
- F. TROUBLE-SHOOTING:
 1. Elevated negative control values (*M. intracellulare*, ATCC #13950) 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 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.

- Low positive control values (*M. avium*, ATCC #25291) 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 AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	ACCULDR (formerly PAL)	LEADER
Cut-off Value	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. intracellulare*, ATCC #13950) and positive control (e.g., *M. avium*, ATCC #25291) should satisfy the following values:

	ACCULDR (formerly PAL)	LEADER
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 AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture biochemical identification methods from three sites, Site 1, 2, and 3, using 120 isolates of the *Mycobacterium avium* and 220 isolates of 25 other *Mycobacterium* species. Gas Liquid Chromatography (GLC) was used for identification at Site 1 in addition to standard culture identification. Standard culture identification is dependent on growth rate, colony morphology, microscopic examination, and a series of biochemical reactions. In addition, the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at Site 4 using a total of 97 *Mycobacterium* strains. HPLC identified 30 isolates as *Mycobacterium avium*, 31 isolates as *Mycobacterium intracellulare*, and 36 isolates from 12 other *Mycobacterium* species. Using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST all isolates were categorized as either positive ($\geq 30,000$ RLU) or negative ($< 30,000$ RLU). The range of observations for negative cultures was 206 to 11,434 RLU and 52,151 to 739,861 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods GLC (Site 1) and HPLC (Site 4) are shown below.

ACCUPROBE /CULTURE, GLC, HPLC IDENTIFICATION

	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Site 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Site 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Site 4	29	0	1	67	96.7%/100%	99.0%
Total	149	0	1	287	99.3%/100%	99.8%

One ACCUPROBE negative, HPLC positive *M. avium* isolate was strongly positive upon retesting with the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

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

Mycobacterium avium

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	25,738	47,730
Standard Deviation	445	668
Coefficient of Variation	1.7%	1.4%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

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

Mycobacterium avium

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	27,929	50,418
Standard Deviation	1,465	2,833
Coefficient of Variation	5.2%	5.6%

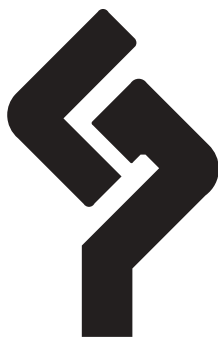
C. SPECIFICITY

A total of 114 ATCC culture isolates were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 92 species from 41 genera. Sixteen isolates of *M. avium*, 49 isolates of 28 other *Mycobacterium* species, and 65 isolates of 40 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST. Only *M. avium* isolates tested produced a positive result using the

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Mycobacterium* species and the representative phylogenetic cross-section species did not react using this kit.

D. RECOVERY

M. avium ribosomal RNA at concentrations ranging from 5×10^{-4} μg and 1×10^{-1} μg per test was assayed in the presence of 30 million cells of either *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*, or *Nocardia asteroides*. No interference of *M. avium* signal was observed and the other organisms present did not react using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM CULTURE IDENTIFICATION TEST.



MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best. Nr. 39002 / Gen-Probe Kat. Nr. 102835/2835)

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Mycobacterium avium (*M. avium*) gehört zum *Mycobacterium avium* Komplex (*M. avium* Komplex), der aus einer Reihe von Organismen besteht, deren taxonomische Verwandtschaftsverhältnisse unklar und umstritten sind, die jedoch zweifelsfrei als humanpathogen gelten (16). Es wurde nachgewiesen, daß *M. avium* bei immungeschwächten Personen schwere Erkrankungen auslöst (12). Die Behandlung dieser Infektion ist schwierig und die Schwere der Erkrankung erfordert eine rasche Diagnose. Darüber hinaus ist die Inzidenz von *M. avium* Komplex in einigen Laboratorien gleich oder größer als die Inzidenz von *M. tuberculosis*.

Die klassischen Methoden zur Identifizierung von Mykobakterien beruhen auf der Färbung von säurefesten Bakterien, gefolgt von Kulturansätzen und biochemischen Tests. Die Identifizierung kann unter diesen Umständen bis zu 2 Monate in Anspruch nehmen (8).

Man geht allgemein davon aus, daß der *M. avium* Komplex aus zwei Spezies besteht: *M. avium* und *M. intracellulare*. Phänotypisch sind *M. avium* und *M. intracellulare* praktisch nicht zu unterscheiden und über biochemische Tests ist keine Differenzierung möglich.

Bei der Identifizierung von *M. avium* und *M. intracellulare* hat sich die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) als hilfreich erwiesen (3); diese Methode ist jedoch zeitaufwendig und von den meisten Labors nicht ohne weiteres durchführbar.

Die serologische Analyse mit α -Antigen Seren wurde ebenfalls zur Differenzierung von *M. intracellulare* und *M. avium* Stämmen eingesetzt und kann für epidemiologische Studien hilfreich sein. Die Serotypisierung ist jedoch nicht immer durchführbar und für die Überwachung von Patienten nur von begrenztem Nutzen. Gegenwärtig werden dem *M. avium* Komplex 28 Serotypen zugeordnet. Historisch bedingt wurden die Serovare 1 bis 3 *M. avium* zugeordnet, während die Serotypen 4 bis 28 *M. intracellulare* zugerechnet wurden (15).

In mehreren Studien verwendete Baess die DNA:DNA Hybridisierung, um die taxonomische Verwandtschaft dieser beiden Spezies zu klären. Auf der Basis ihrer Analysen zog sie die Schlußfolgerung, daß die Serovare 4, 5, 6 und 8, welche bis dahin *M. intracellulare* zugeordnet wurden, in Wirklichkeit zur Spezies *M. avium* gehörten. Der Status von Serovar 9 blieb unklar (1, 2).

Saito *et al.* arbeitete ebenfalls mit einem DNA Sondentest und schlug für die 28 Serovare folgende Neueinteilung vor: Serovar 1 bis 6, 8 bis 11 und 21 zu *M. avium*; Serovar 7, 12-20 und 25 zu *M. intracellulare*, die Serovare 22 bis 28 (außer Serovar 25) wurden als heterogen betrachtet und konnten keine der beiden Spezies zugeordnet werden (13). Darüber hinaus konnten einige Stämme nicht serotypisiert werden und einige agglutinierten mit mehr als einem Antiserum.

Desweiteren wurden Untersuchungen veröffentlicht, in denen DNA-Sonden zur Speziesidentifizierung innerhalb des *Mycobacterium avium* Komplexes eingesetzt wurden. Dabei wurden DNA-Sonden auch für epidemiologische Studien und die Analyse der geographische Verbreitung von *M. avium* und *M. intracellulare* verwendet (5-7, 9, 11, 14).

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert *M. avium* aus Kulturisolaten innerhalb von 1 Stunde. Die Identifizierung basiert auf dem Nachweis von rRNA Sequenzen, die für *M. avium* spezifisch sind. Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ist eine schnelle, objektive und genaue Methode zur Identifizierung von *M. avium* aus Kulturisolaten.

PRINZIP

Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (10). Der ACCUPROBE Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenzmarker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das GEN-PROBE Luminometer mißt das von den DNA-RNA-Hybriden abgegebene Lichtsignal. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn der vom Luminometer angezeigte Wert gleich oder größer ist als der Grenzwert (cut-off). Liegt der Wert unterhalb des Grenzwertes, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZIEN

Die Reagenzien des ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM SONDEN-TESTKIT

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

ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGSKIT

<u>Reagenz 1</u> (Lysereagenz) (1) Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid.	1 x 10 ml
<u>Reagenz 2</u> (Hybridisierungspuffer) (2) Pufferlösung.	1 x 10 ml

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

GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZIIEN-KIT

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

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie bei der Testdurchführung die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (4).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *M. avium* aus Kulturisolaten.
- D. Verwenden Sie nur die mitgelieferten oder empfohlenen Einweg-Labormaterialien.
- E. Die Bearbeitung der Kulturen und alle weiteren Schritte bis zur Hitzeinaktivierung sollten unter einer Laminar Flow Box erfolgen.
- F. 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.
- G. Vermeiden Sie jeden Kontakt der Detektionsreagenzien I und II mit der Haut, den Augen oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten eines dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

Die Sonden-Reagenzröhrchen 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 AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *Mycobacterium avium* aus Kulturisolaten.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Festmedien (z.B. Löwenstein-Jensen Schrägagar oder Middlebrook 7H10 oder 7H11 Medien) angezüchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um *M. avium* 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 Zellen anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Zellen 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 größer oder gleich McFarland Standard 1 ist. Pipettieren Sie 100 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in ein Lyseröhrchen, wie im Abschnitt VORBEREITUNG DER PROBEN beschrieben.

MITGELIEFERTER MATERIALIEN

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
(bioMérieux Best.Nr. 39002 / Gen-Probe Kat. Nr. 102835/2835)

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.

ZUSÄTZLICHE VERFÜGBARE MATERIALIEN:

GEN-PROBE LEADER 50i Luminometer

(bioMérieux Best.Nr. 39400 / Gen-Probe Kat. Nr. 103100i/3100i)

GEN-PROBE Ultraschallbad

(bioMérieux Best.Nr. 39409 / Gen-Probe Kat. Nr. 901104/T460)

ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)
GEN-PROBE DETEKTIONSREAGENZKIEN-KIT
(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 gründlich 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° ± 1 °C und einen weiteren Heizblock oder ein Wasserbad auf 95° ± 5 °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 Kontrollstämme mitgeführt werden. Als Positivkontrolle kann eine *M. avium* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 25291) dienen, während eine *M. intracellulare* Kultur (z.B. ATCC 13950) als Negativkontrolle verwendet 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. Lyseröhrchen 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 Sondenöhrchen. 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 Sondenöhrchen für die Kulturisolate und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 100 μl der lysierten Proben aus den Lyseröhrchen in die entsprechenden Sondenöhrchen.
4. Verschließen Sie die Sondenöhrchen 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 Sondenöhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 μl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt gleichmäßig zu durchmischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenöhrchen für 5 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenöhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen und werfen Sie diese. **Die Röhrchen innerhalb der nächsten Stunde im Luminometer messen.**

G. DETEKTION

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

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß das Wasserbad oder der Heizblock im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
- C. REAKTIONSDAUER: Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die

Sondenröhrchen während des SELEKTIONSSCHRITTES mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.

- D. WASSERBAD: Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so daß die Röhrchen mit dem Lyseagenz bis zum Dichtungsring ins Wasser reichen, jedoch nicht darüber hinaus. Achten Sie außerdem 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. intracellulare* ATCC 13950) über 10.000 RLU (Relative Light Units) durch zu geringe Keimzahlen oder falsche Beschallung 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 oder zu alter Kulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium Kulturmedium überimpfen und inkubieren.
 - 2. Schwach positive Kontrollwerte (*M. avium* ATCC 25291) 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 bzw. zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden auf der Basis folgender 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.

	ACCULDR (vormals PAL)	LEADER
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. intracellulare*, ATCC 13950) und die Positivkontrolle (z.B. *M. avium*, ATCC 25291) müssen folgenden Sollwerten entsprechen.

	ACCULDR (vormals PAL)	LEADER
Negativkontrolle	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Positivkontrolle	> 900 PLU	> 30.000 RLU

LIMITIERUNGEN

Diese Methode wurde mit frischen Kulturen getestet, die auf den im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG angegebenen Festmedien und in Flüssigkulturen 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 AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 3 Laboratorien (Labor 1, 2 und 3) mit klassischen Kulturverfahren und anschließender biochemischer Identifizierung verglichen. Insgesamt wurden 120 *Mycobacterium avium* und 220 Isolate von 25 anderen *Mycobacterium* Spezies getestet. In Labor 1 wurde zusätzlich zu den klassischen Kulturverfahren die Flüssiggaschromatographie (Gas Liquid Chromatography, GLC) eingesetzt. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfaßten die Wachstumsgeschwindigkeit, Kolonien-morphologie, mikroskopische Untersuchung und eine Reihe biochemischer Tests. Außerdem wurde der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST in einem 4. Labor mit der HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) verglichen, dabei wurden 97 *Mycobacterium* Stämme getestet. Die HPLC identifizierte 30 Isolate als *M. avium*, 31 Isolate als *M. intracellulare* und 36 Isolate als 12 andere *Mycobacterium* Spezies. Die Stämme wurden mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST entweder als positiv (≥ 30.000 RLU) oder negativ (< 30.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 206 bis 11.434 RLU und für die positiven Kulturen ein Bereich von 52.151 bis 739.861 RLU ermittelt. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden, GLC (Labor 1) und der HPLC Methode (Labor 4) ist im folgenden angegeben.

ACCUPROBE / KULTUR, GLC und HPLC

	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrel.
Labor 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Labor 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Labor 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Labor 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Gesamt	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Ein ACCUPROBE-negativer und HPLC-positiver *M. avium* Stamm wurde nochmals getestet und ergab mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ein stark positives Ergebnis.

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS wurden zwei Konzentrationen der rRNA von *M. avium* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Mycobacterium avium

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert (RLU)	25.738	47.730
Standardabweichung	445	668
Variationskoeffizient	1,7%	1,4%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Berechnung der Inter-Assay Präzision wurden die beiden gleichen Konzentrationen *M.avium* rRNA in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Mycobacterium avium

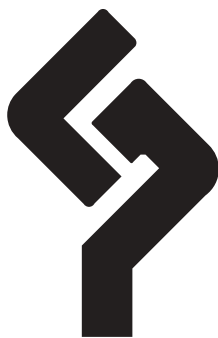
Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert (RLU)	27.929	50.418
Standardabweichung	1.465	2.833
Variationskoeffizient	5,2%	5,6%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 114 ATCC Stämme mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen Stämmen handelte es sich um insgesamt 92 Spezies aus 41 Gattungen. 16 *M. avium* Stämme, 49 Stämme von 28 anderen *Mycobacterium* Spezies und 65 Stämme von 40 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Nur *M. avium* Stämme reagierten mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv. Andere *Mycobacterium* Spezies und die Spezies aus dem repräsentativen phylogenetischen Querschnitt reagierten mit diesem Test nicht.

D. WIEDERFINDUNG

M. avium rRNA wurde in Konzentrationen von 5×10^{-4} µg und 1×10^{-1} µg pro Test in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die entweder zu *M.intracellulare*, *M. tuberculosis* oder *Nocardia asteroides* gehörten. Es wurden keine Interferenzen oder Kreuzreaktionen mit *M. avium* festgestellt.





AccuProbe

TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM AVIUM ISOLE PAR CULTURE

(bioMérieux réf. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

UTILISATION

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

INTRODUCTION

Mycobacterium avium (*M. avium*) fait partie du complexe *Mycobacterium avium* (complexe *M. avium*) qui regroupe un certain nombre de microorganismes dont les relations taxinomiques sont à la fois mal connues et controversées, mais dont le rôle pathogène chez l'homme est indubitable (16). Chez les patients immunodéprimés, l'infection par *M. avium* provoque une maladie grave (12). Le traitement de cette infection est difficile et sa gravité nécessite un diagnostic rapide. De plus, certains laboratoires identifient en routine au moins autant de souches du complexe *M. avium* que de souches de *M. tuberculosis*.

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 (8).

On admet généralement que le complexe *M. avium* comprend deux espèces: *M. avium* et *M. intracellulare*. Les phénotypes de *M. avium* et *M. intracellulare* sont pratiquement identiques et les tests biochimiques ne permettent pas de les différencier.

M. avium et *M. intracellulare* peuvent être identifiés par HPLC (high performance liquid chromatography) (3); cependant cette méthode exige beaucoup de temps et peu de laboratoires peuvent la pratiquer.

L'analyse sérologique par des sérums α -antigéniques a également été utilisée pour la différenciation des deux souches du complexe, et peut s'avérer utile dans les études épidémiologiques. Cependant, le sérotypage est limité à certaines applications et présente peu d'intérêt quant au suivi des patients. On admet actuellement qu'il existe 28 sérovars à l'intérieur du complexe *M. avium*, et au fil du temps ils ont été attribués soit à *M. avium* soit à *M. intracellulare*. Ainsi, on a longtemps considéré que les sérovars 1 à 3 appartenaient à *M. avium*, alors que les sérovars 4 à 28 étaient attribués à *M. intracellulare* (15).

Au cours de plusieurs études, Baess a fait appel à la technique d'hybridation ADN-ADN pour tenter de clarifier les relations taxinomiques entre ces deux espèces. D'après les résultats de ses analyses, elle a conclu que les sérovars 4, 5, 6 et 8 auparavant classés *M. intracellulare* appartenaient en réalité à l'espèce *M. avium*; elle n'est pas parvenue à définir de façon formelle le statut du sérovar 9 (1, 2).

Saito et son équipe ont également utilisé la technique des sondes ADN et ont proposé de réattribuer les 28 sérovars de la façon suivante: les sérovars 1 à 6, 8 à 11, et 21 appartiendraient à *M. avium*; les sérovars 7, 12 à 20, et 25 à *M. intracellulare*; les sérovars 22 à 28 (sauf le sérovar 25), considérés comme hétérogènes, n'ont pu être classés (13). Par ailleurs, le sérovar de plusieurs souches n'a pu être déterminé, et d'autres ont agglutiné avec plusieurs antisérums.

D'autres publications ont rapporté l'utilisation de sondes ADN pour l'identification des espèces du complexe *M. avium*. Ces recherches avaient pour but l'étude épidémiologique et l'analyse de la distribution géographique de *M. avium* et *M. intracellulare* (5, 6, 7, 9, 11, 14).

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. AVIUM* ISOLE PAR CULTURE identifie *M. avium* isolé à partir d'une culture en moins d'une heure. L'identification est basée sur la détection de séquences d'ARN ribosomal spécifiques de *M. avium*. Le TEST ACCUPROBE permet une identification rapide, objective et précise.

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 bicaténares stables (10). 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.

RÉACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. AVIUM* ISOLE PAR CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET SONDE POUR *M. AVIUM* ACCUPROBE

<u>Réactif Sonde</u> (P)	(4 x 5 tubes)
<i>M. avium</i> .	
<u>Tube de Lyse</u> (LT)	(1 x 20 tubes)
Billes de verre et tampon.	

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE ACCUPROBE

<u>Réactif 1</u> (Réactif de Lyse) (1)	1 x 10 ml
Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.	
<u>Réactif 2</u> (Tampon d'Hybridation) (2)	1 x 10 ml
Solution tamponnée.	
<u>Réactif 3</u> (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 (4).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *M. avium* 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. Eviter tout contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer à l'eau. Si ces réactifs sont renversés, les diluer avec de l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

Les tubes de Réactif 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. AVIUM ISOLE PAR 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. AVIUM ISOLE PAR CULTURE* est conçu pour déterminer l'identité de *M. avium* 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. avium*. 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 à partir de 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 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. AVIUM ISOLE PAR CULTURE
(bioMérieux réf. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

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

McFarland 1 Nephelometer Standard

*Les emplacements à l'intérieur du bloc chauffant doivent être adaptés à des tubes de 12 x 75 mm. 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

(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 $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et un autre bloc chauffant ou bain-marie à $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
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. avium* (par ex. American Type Culture Collection, ATCC 25291) comme contrôle positif, et une culture de *M. intracellulare* (ATCC 13950) 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 µl 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 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'aide d'un Vortex pour obtenir un mélange homogène.
2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 5 minutes à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ au bain-marie ou dans le bloc chauffant.
3. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant et les laisser à température ambiante pendant au moins 5 minutes. Ôter et jeter les bouchons. **Lire les résultats a 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. intracellulare*, ATCC 13950), 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.

- Des valeurs faibles de contrôle positif (*M. avium*, ATCC 25291), inférieures à 30.000 RLU sur le LEADER ou à 900 PLU au 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. AVIUM* ISOLE PAR 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.

	ACCULDR (anciennement PAL)	LEADER
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. intracellulare*, ATCC 13950) et positifs (par ex. *M. avium*, ATCC 25291) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	ACCULDR (anciennement PAL)	LEADER
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. AVIUM* ISOLE PAR 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. AVIUM* ISOLE PAR CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique sur trois sites, site 1, 2 et 3, en utilisant 120 souches de *M. avium* et 220 souches de 25 autres espèces de mycobactéries. La technique de GLC (gas liquid chromatography) a été utilisée sur le site 1 en plus de l'identification traditionnelle sur culture. L'identification sur culture dépend du taux de croissance et repose sur l'étude de la morphologie des colonies, l'examen microscopique et une série de réactions biochimiques. Par ailleurs, le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE *M. AVIUM* ISOLE PAR CULTURE a été comparé à la technique HPLC sur le site 4, sur un total de 97 souches de mycobac-

téries. 30 souches de *M. avium*, 31 souches de *M. intracellulare* et 36 souches de 12 autres espèces de mycobactéries ont été identifiées par HPLC. Les souches ont été déterminées soit positives (≥ 30.000 RLU) soit négatives (< 30.000 RLU). Les cultures négatives ont donné des résultats compris entre 206 et 11.434 RLU et les cultures positives des résultats se situant entre 52.151 et 739.861 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification, GLC (site 1) et HPLC (site 4) figure ci-dessous.

ACCUPROBE / CULTURE, GLC, HPLC

	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Site 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Site 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Site 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Total	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Une souche de *M. avium* ACCUPROBE-négative et HPLC-positive a été retestée et a donné un résultat fortement positif avec le TEST ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM.

PERFORMANCES DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

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

Mycobacterium avium

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	25.738	47.730
Ecart-type	445	668
Coefficient de variation	1,7%	1,4%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

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

Mycobacterium avium

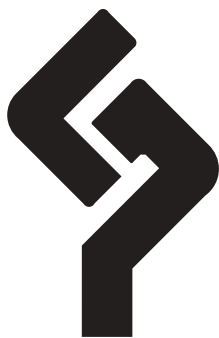
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	27.929	50.418
Ecart-type	1.465	2.833
Coefficient de variation	5,2%	5,6%

C. SPÉCIFICITÉ

Un total de 114 souches de cultures ATCC a été étudié à l'aide du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE M. AVIUM.ISOLE PAR CULTURE. Ces souches comprenaient 92 espèces issues de 41 genres différents. Un panel phylogénétique de 16 souches de *M. avium*, 49 souches de 28 autres espèces de mycobactéries et 65 souches de 40 autres genres a été testé. Seules les souches de *M. avium* testés ont donné un résultat positif avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE M. AVIUM ISOLE PAR CULTURE.

D. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions d'ARN ribosomal de *M. avium* dont les concentrations étaient comprises entre 5×10^{-4} µg et 1×10^{-1} µg par test ont été testées en présence de 30 millions de microorganismes appartenant à l'une des espèces suivantes: *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* ou *Nocardia asteroides*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE M. AVIUM ISOLE PAR CULTURE.





AccuProbe

TEST DE IDENTIFICACION DE MYCOBACTERIUM AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

UTILIZACION

EL TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO es un test de identificación rápida mediante sonda ADN de *M. avium* aislado a partir de un cultivo. Este test utiliza la técnica de hibridación de los ácidos nucleicos.

INTRODUCCION

Mycobacterium avium (*M. avium*) forma parte del complejo *Mycobacterium avium* (complex *M. avium*) que reúne cierto número de microorganismos cuyas relaciones taxonómicas son al mismo tiempo insuficientemente conocidas y controvertidas, pero sobre cuyo papel patógeno en el hombre no caben dudas (16). En pacientes inmunodeprimidos, la infección por *M. avium* provoca una enfermedad grave (12). El tratamiento de esta infección es difícil y su gravedad exige un diagnóstico rápido. Algunos laboratorios diagnostican por lo demás, en forma rutinaria, un número al menos igualmente alto de cepas del complejo *M. avium* que de cepas de *M. tuberculosis*.

Los métodos clásicos de identificación de las micobacterias se basan en la detección de bacilos ácido-alcoholo-resistentes mediante coloración de Ziehl-Nielsen seguida del cultivo y del análisis bioquímico. La identificación puede necesitar dos meses (8).

Se admite en general que el complejo *M. avium* incluye dos especies: *M. avium* y *M. intracellulare*. Los fenotipos de *M. avium* y *M. intracellulare* son prácticamente idénticos y los tests bioquímicos no permiten diferenciarlos.

M. avium y *M. intracellulare* pueden ser identificados mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (3); sin embargo, este método exige mucho tiempo y pocos laboratorios pueden realizarlo.

Para diferenciar ambas cepas del complejo se ha utilizado también el análisis serológico mediante sueros α -antigénicos, y puede resultar útil en los estudios epidemiológicos. Sin embargo, la determinación del serotipo está limitada a determinadas aplicaciones y presenta escaso interés en cuanto al seguimiento de los pacientes. Se acepta actualmente que existen 28 serovariedades dentro del complejo *M. avium*, y con el tiempo han sido atribuidas bien a *M. avium*, o a *M. intracellulare*. Es así como se consideró durante mucho tiempo que las serovariedades 1 a 3 pertenecían a *M. avium*, mientras que las serovariedades 4 a 28 eran atribuidas a *M. intracellulare* (15).

En varios estudios realizados, Baess ha recurrido a la técnica de hibridación ADN-ADN para tratar de clarificar las relaciones taxonómicas entre ambas especies. En función de los resultados de sus análisis, ha concluido que las serovariedades 4, 5, 6 y 8, antes clasificadas como *M. intracellulare*, pertenecían en realidad a la especie *M. avium*; no consiguió definir de modo formal el carácter de la serovariedad 9 (1, 2).

Saito y su equipo utilizaron también la técnica de las sondas ADN y propusieron reatribuir las 28 serovariedades como sigue: las serovariedades 1 a 6, 8 a 11 y 21 pertenecerían a *M. avium*; las serovariedades 7, 12 a 20, y 25 a *M. intracellulare*; las serovariedades 22 a 28 (salvo la serovariedad 25), consideradas como heterogéneas, no pudieron ser clasificadas (13). Además, no pudo determinarse la serovariedad de varias cepas, y otras aglutinaron con varios antisueros..

Otras publicaciones han mencionado la utilización de sondas ADN para identificar especies del complejo *M. avium*. Estas investigaciones tenían como objetivo el estudio epidemiológico y el análisis de la distribución geográfica de *M. avium* y *M. intracellulare* (5, 6, 7, 9, 11, 14).

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO identifica en menos de una hora un *M. avium* aislado a partir de un cultivo. La identificación se basa en la detección de secuencias específicas de ARN ribosómico de *M. avium*. El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO permite una identificación rápida, objetiva y precisa de *M. avium* aislado a partir de un cultivo.

PRINCIPIO

Los tests por hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de ácidos nucleicos para aparearse de manera específica formando complejos bicatenarios estables (10). 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 estable ADN-ARN. 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; es negativo si indica un valor inferior.

REACTIVOS

Los reactivos utilizados para el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO son suministrados en tres kits diferentes:

KIT SONDA PARA *M. AVIUM* ACCUPROBE

<u>Reactivo Sonda</u> (P)	(4 x 5 tubos)
<i>M. avium</i> .	
<u>Tubo de Lisis</u> (LT)	(1 x 20 tubos)
Bolas de vidrio y tampón.	

KIT DE REACTIVOS PARA IDENTIFICACION DE CULTIVO ACCUPROBE

<u>Reactivo 1</u> (Reactivo de Lisis) (1)	1 x 10 ml
Solución tamponada que contiene 0,04% de azida sódica.	
<u>Reactivo 2</u> (Tampón de Hibridación) (2)	1 x 10 ml
Solución tamponada.	
<u>Reactivo 3</u> (Reactivo de Selección) (3)	1 x 60 ml
Solución tamponada.	

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

<u>Reactivo de Detección I (RI)</u>	1 x 240 ml
0,1% de agua oxigenada en ácido nítrico 0,001 N.	
<u>Reactivo de Detección II (RII)</u>	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 (4).
- C. Utilizar sólo para la identificación de *M. avium* aislado a partir de un cultivo.
- D. Utilizar sólo 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 recinto de seguridad microbiológica de clase II.
- F. Los reactivos de este kit contienen azida sódica susceptible de formar, por reacción con el plomo o el cobre de los conductos, azidas metálicas explosivas. Al eliminar estos reactivos enjuagar con agua abundante para prevenir la formación de azidas en los tubos.
- G. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel, los ojos y las membranas mucosas. 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 de Reactivo Sonda deben ser conservados en bolsas de aluminio a 2° - 8°C. Antes de la apertura 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. AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO* pueden ser conservados 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. AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO* ha sido diseñado para determinar la identidad de *M. avium* aislado a partir de un cultivo.

- A. **Identificación a partir de un cultivo en medio sólido.** El test puede ser realizado en cultivos realizados en un medio sólido apropiado, como una gelosa inclinada de Löwenstein-Jensen, o un medio de Middlebrook 7H10 o 7H11, cuando se observa una morfología que evoque la presencia de *M. avium*. La muestra puede ser analizada apenas la proliferación sea visible y durante los sesenta días de incubación siguientes.
 1. La muestra de cultivo puede ser obtenida mediante un asa de plástico desechable de 1µl, un asa metálica o una aguja de plástico desechable. No utilizar torundas dada la pequeña cantidad de líquido en el cual serán puestas en suspensión las micobacterias.

2. Evitar extraer medio de cultivo junto con las micobacterias.
3. En esta etapa, el manipulador puede decidir sembrar otro medio de cultivo para confirmar la pureza de la muestra aislada.

B. **Identificación a partir de un caldo de cultivo.** El test puede ser realizado en cultivos realizados en caldo de cultivo de Middlebrook 7H9 que posea una turbidez superior o igual a 1 McFarland. Extraer con pipeta una muestra de 100 µl de 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. AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO
(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

20 Tests

Reactivo Sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de Lisis (LT)	1 x 20 tubos

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Asas de 1µl de plástico estéril, asas metálicas o agujas de plástico para extraer las colonias

Cepas de control de los cultivos

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

Baño maría o bloque calefactor (95° ± 5°C)*

Micropipetas (100 µl, 300 µl)

Pipetas de repetición (100 µl, 300 µl)

Vortex

Patrón de nefelómetro McFarland 1

*Los emplazamientos dentro del bloque calefactor deben estar adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda la utilización de bloques calefactores 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 calefactor (60° ± 1°C)

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

Bloque calefactor (95° ± 1°C)

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

Bloque calefactor 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)

Portatubos para el sonicador GEN-PROBE

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

KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACION DE CULTIVOS ACCUPROBE

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

KIT DE REACTIVOS DE DETECCION GEN-PROBE

(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.
 - a. El agua del baño de ultrasonidos debe encontrarse enteramente desgasificada antes de la manipulación con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos.
 - b. Para desgasificar enteramente el agua, hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos.
2. Regular un bloque calefactor o baño maría a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y otro bloque calefactor o baño maría a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
3. Preparar el luminómetro GEN-PROBE. Verificar que la cantidad de Reactivos de Detección I y II es suficiente para realizar los tests.

B. CONTROLES

Deben analizarse rutinariamente cepas de control positivo y negativo en cada laboratorio, conforme a la reglamentación vigente. Se puede utilizar un cultivo de *M. avium* (por ej., American Type Culture Collection, ATCC 25291) como control positivo, y un cultivo de *M. intracellulare* (ATCC 13950) 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 mediante pipeta 100 μl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y 100 μl de Reactivo 2 (Tampón de hibridación) a todos los Tubos de Lisis. **Si el test se efectúa en cepas aisladas a partir de un caldo de cultivo, no añadir Reactivo 1 a los Tubos de Lisis.**
3. Transferir la muestra proveniente del medio sólido o 100 μl de caldo de cultivo correctamente homogeneizado en los Tubos de Lisis, conforme a las instrucciones dadas en el párrafo TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA. Si el test se realiza en un cultivo en medio sólido, agitar el asa o la aguja en la solución para poner en suspensión las células.
4. Volver a tapar los Tubos de Lisis y agitarlos brevemente con un Vortex.

D. LISIS DE LA MUESTRA

1. Insertar los Tubos de Lisis en el portatubos del sonicador de manera que la mezcla reactiva del fondo de los tubos se encuentre sumergida, pero manteniendo los tapones fuera del agua. Colocar el portatubos en su lugar. **LOS TUBOS NO DEBEN EN MODO ALGUNO TOCAR EL FONDO O LAS PAREDES DEL SONICADOR.**
2. Hacer funcionar el sonicador durante 15 minutos.
3. Colocar a continuación los tubos que contienen los microorganismos lisados mediante sonicación en el bloque calefactor o baño maría a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
4. Retirar cuidadosamente los Tubos de Lisis del bloque calefactor o baño maría.

E. HIBRIDACION

1. Cortar horizontalmente la parte superior de las bolsas de aluminio. Retirar la cantidad necesaria de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Cerrar la bolsa herméticamente plegando varias veces su extremo y fijándolo con cinta adhesiva o con una pinza. **No retirar la bolsa desecante.**
2. Identificar una cantidad suficiente de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.

3. Extraer 100 μ l de muestra lisada de los Tubos de Lisis y distribuirlos en los tubos de Reactivo Sonda correspondientes.
4. Volver a tapar los tubos de 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 calefactor.

F. SELECCION

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

G. DETECCION

1. Seleccionar el protocolo apropiado en el luminómetro.
2. Con el fin de retirar cualquier residuo de la superficie de los tubos, secarlos con papel absorbente húmedo. Colocar a continuación los tubos en el luminómetro y seguir las instrucciones.
3. Cuando el análisis ha terminado, 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 agitarlo 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 calefactor a la temperatura preconizada.
- C. DURACION DE LAS OPERACIONES: las reacciones de hibridación y de selección son dependientes del tiempo. La hibridación debe durar por lo menos 15 minutos pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCION, incubar los tubos de Reactivo Sonda durante por lo menos 5 minutos pero no más de 6 minutos.
- D. BAÑO MARIA: el nivel de agua debe ser suficientemente alto para que los Tubos de Lisis se encuentren sumergidos hasta el anillo de cierre, pero no por encima de éste. Verificar además que todo el líquido de reacción que se encuentra en los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergido.
- E. UTILIZACION DEL VORTEX: es esencial disponer de una mezcla homogénea durante las etapas de PREPARACION DE LA MUESTRA y de SELECCION, en particular después de añadir los microorganismos a los Reactivos 1 y 2 y después de añadir el Reactivo 3.
- F. RESOLUCION DE INCIDENTES
 1. Pueden observarse valores elevados de control negativo (*M. intracellulare*, ATCC 13950), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units = Unidades de Luz Relativas) en el LEADER o a 300 PLU (Photometric Light Units = Unidades de Luz Fotométricas), en el ACCULDR (antiguamente PAL) cuando la homogeneización ha sido insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de Selección) o bien cuando se encuentran presentes diferentes tipos de colonias. Para verificar si se

trata de un cultivo mixto, se puede volver a sembrar una parte en un medio gelosado adecuado e incubarla.

2. Pueden observarse valores bajos de control positivo (*M. avium*, ATCC 25291), inferiores a 30.000 RLU en el LEADER o a 900 PLU, en el ACCULDR (antiguamente PAL) cuando el número de gérmenes es insuficiente, cuando la sonicación no ha sido correctamente realizada o cuando el test se realiza en cultivos mixtos o demasiado viejos. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede volver a sembrar una parte en un medio gelosado adecuado e incubarla.

RESULTADOS

A. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN 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 consideradas positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se ubica en una zona de incertidumbre, el test debe repetirse. Si el segundo análisis sigue dando resultados equívocos, hay que volver a sembrar la cepa con el fin de verificar su pureza.

	ACCULDR (antiguamente PAL)	LEADER
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. intracellulare*, ATCC 13950) y positivos (p. ej., *M. avium*, ATCC 25291) deben cumplir los siguientes valores:

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

LIMITES DEL TEST

Este método ha sido probado en cultivos frescos realizados en medios sólidos y en los tipos de caldos de cultivo mencionados en el párrafo TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA. Los resultados de este test, realizado directamente en muestras clínicas (muestras de orina, fecales o respiratorias) no han sido evaluados. Los resultados del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO deben ser interpretados en función de otros datos de laboratorio y puestos en correlación con los datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* EN UN CULTIVO ha sido comparado con los métodos clásicos de cultivo con identificación bioquímica en tres sitios, sitio (1, 2 y 3), utilizando 120 cepas de *M. avium* y 220 cepas de otras 25 especies de micobacterias. La técnica de GLC (gas liquid chromatography = cromatografía líquida de gases) fue utilizada en el sitio 1 además de la identificación tradicional en cultivo. La identificación en cultivo depende de la tasa de crecimiento y descansa en el estudio de la morfología de las colonias, el examen microscópico y una serie de reacciones bioquímicas. Por lo demás, el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO ha sido comparado con la técnica HPLC en el sitio

4 sobre un total de 97 cepas de micobacterias. 30 cepas de *M. avium*, 31 cepas de *M. intracellulare* y 36 cepas de otras 12 especies de micobacterias han sido identificadas mediante HPLC. Las cepas han sido determinadas como positivas (≥ 30.000 RLU) o como negativas (< 30.000 RLU). Los cultivos negativos han dado resultados entre 206 y 11.434 RLU y los cultivos positivos, resultados que se sitúan entre 52.151 y 739.861 RLU. La comparación de estos resultados con los métodos clásicos de identificación, GLC (sitio 1) y HPLC (sitio 4) figura a continuación:

ACCUPROBE / CULTIVO, GLC, HPLC IDENTIFICACION

	Pos Pos	Pos Neg.	Neg. Pos	Neg. Neg.	Sensibilidad/ Especificidad	Tasa de Concordancia
Sitio 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Sitio 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Sitio 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Sitio 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Total	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Una cepa de *M. avium* ACCUPROBE-negativa y HPLC-positiva ha sido analizada nuevamente y ha dado un resultado fuertemente positivo con el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE M. AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO.

RESULTADOS DEL TEST

A. PRECISION DENTRO DEL ENSAYO

La precisión dentro del ensayo TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE M. AVIUM AISLADO EN UN CULTIVO ha sido calculada analizando dos concentraciones diferentes de ARN ribosómico de *M. avium* 10 veces en una misma serie.

Mycobacterium avium

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	25.738	47.730
Desviación típica	445	668
Coefficiente de variación	1,7%	1,4%

B. PRECISION ENTRE ENSAYOS

La precisión entre ensayos ha sido calculada analizando en simple dos concentraciones diferentes de ARN ribosómico de *M. avium*, durante 12 series distintas.

Mycobacterium avium

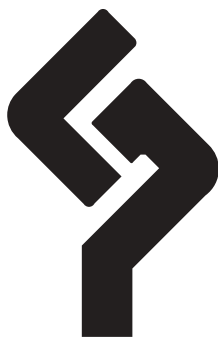
Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	27.929	50.418
Desviación típica	1.465	2.833
Coefficiente de variación	5,2%	5,6%

C. ESPECIFICIDAD

Fueron estudiadas un total de 114 cepas de cultivos ATCC utilizando el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO . Estas cepas incluían 92 especies provenientes de 41 géneros diferentes. Fue estudiado un panel filogenético de 16 cepas de *M. avium*, 49 cepas de otras 28 especies de micobacterias y 65 cepas de otros 40 géneros. Únicamente las cepas de *M. avium* analizadas dieron resultado positivo con el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO.

D. TEST DE SOBRECARGA

Diluciones de ARN ribosómico de *M. avium* cuyas concentraciones se encontraban entre 5×10^{-4} μg y 1×10^{-1} μg por test fueron analizadas en presencia de 30 millones de microorganismos que pertenecían a una de las siguientes especies: *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* o *Nocardia asteroides*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada utilizando el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACION DE *M. AVIUM* AISLADO EN UN CULTIVO.





AccuProbe

TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM AVIUM ISOLATO A PARTIRE DA UNA COLTURA

(bioMérieux cod. 39002 / Gen-Probe Cat. N. 102835/2835)

IMPIEGO

IL TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA è un test che impiega una sonda a DNA per l'identificazione rapida del M. Avium isolato a partire da una coltura. Questo test si avvale della tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Il *Mycobacterium Avium* (*M. Avium*) appartiene al *Mycobacterium Avium* complex (*M. Avium* complex), composto da un certo numero di microrganismi le cui relazioni tassonomiche non solo sono scarsamente note e controverse, ma giocano quasi certamente un ruolo patogeno nell'uomo (16). In soggetti immunodepressi l'infezione da *M. Avium* provoca una grave malattia (12). Trattare queste infezioni è un compito arduo e la loro gravità pone l'esigenza di stabilire una rapida diagnosi. Inoltre, determinati laboratori identificano sistematicamente una quantità di ceppi del *M. avium* complex uguale a quella di ceppi del *M. tuberculosis*.

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 essere necessari fino a due mesi per l'identificazione di un ceppo (8).

In genere, si afferma che il *M. Avium* complex comprende due specie: *M. avium* e *M. intracellulare*. I fenotipi di questi due microrganismi sono praticamente identici e i test biochimici non consentono una loro differenziazione.

Il *M. avium* e il *M. intracellulare* possono essere identificati con l'HPLC (cromatografia liquida ad alta risoluzione) (3); tuttavia questo metodo richiede molto tempo e solo pochi laboratori possono praticarlo.

Per differenziare le due specie è stata anche impiegata l'analisi sierologica con sieri α -antigenici, che può risultare utile negli studi epidemiologici. La sierotipizzazione viene limitata a determinate applicazioni e nel caso del monitoraggio dei pazienti essa riveste scarso interesse. Attualmente si è d'accordo nell'affermare che vi siano 28 serovar all'interno del *M. avium* complex e nel corso del tempo sono stati attribuiti ora al *M. avium* ora al *M. intracellulare*. Per molto tempo si è quindi pensato che i serovar da 1 a 3 appartenessero al *M. avium* mentre i serovar da 4 a 28 venivano attribuiti al *M. intracellulare* (15).

Nel quadro di numerosi studi, Baess è ricorsa alla tecnica dell'ibridazione DNA-DNA per cercare di far luce sulle relazioni tassonomiche fra queste due specie. Dai risultati scaturiti dalle sue analisi, si vince che i serovar 4, 5, 6 e 8 precedentemente classificati *M. intracellulare* appartenerebbero in realtà alla specie *M. avium*; Baess non è riuscita invece a definire in modo formale lo status del serovar 9 (1, 2).

Saito e il suo team hanno impiegato anch'essi la tecnica delle sonde a DNA e hanno proposto una riattribuzione dei 28 serovar nei seguenti termini: i serovar da 1 a 6, da 8 a 11 e 21 appartenerebbero al *M. avium*, i serovar 7, da 12 a 20 e 25 appartenerebbero al *M. intracellulare*; non è stato possibile classificare i serovar da 22 a 28 (fatta eccezione per il serovar 25) considerati eterogenei (13). D'altronde, non è stato possibile determinare il serovar di parecchi ceppi, ed altri si sono combinati con numerosi antisieri.

Altre pubblicazioni hanno evidenziato l'impiego delle sonde a DNA per identificare delle specie del *M. avium* complex. Queste ricerche avevano come finalità lo studio epidemiologico e l'analisi distributiva da un punto di vista geografico del *M. avium* e del *M. intracellulare* (5, 6, 7, 9, 11, 14).

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL *M. AVIUM* ISOLATO DA UNA COLTURA rivela l'*M. avium* isolato a partire da una coltura in meno di un'ora. L'identificazione si basa sull'evidenziazione delle sequenze di RNA ribosomiale specifiche del *M. avium*. Il TEST ACCUPROBE consente un'identificazione rapida, obiettiva e precisa.

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 composti stabili a doppia catena (10). 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 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 misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato sarà positivo se il luminometro indica un valore superiore o uguale al valore soglia; sarà negativo se indica un valore inferiore.

REAGENTI

I Reagenti impiegati nel TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL *M. AVIUM* ISOLATO DA UNA COLTURA sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER *M. AVIUM* ACCUPROBE

<u>Reagente Sonda</u> (P)	(4 x 5 provette)
<i>Mycobacterium avium</i> .	
<u>Provetta di Lisi</u> (LT)	(1 x 20 provette)
Sfere di vetro e tampone.	

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCUPROBE

<u>Reagente 1</u> (Reagente di Lisi) (1)	1 x 10 ml
Soluzione tamponata contenente 0,04% di sodio azide.	
<u>Reagente 2</u> (Tampone di Ibridazione) (2)	1 x 10 ml
Soluzione tamponata.	
<u>Reagente 3</u> (Reagente di Selezione) (3)	1 x 60 ml
Soluzione tamponata.	

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE GEN-PROBE

<u>Reagente di Rivelazione I (RI)</u>	1 x 240 ml
0,1% di acqua ossigenata in acido nitrico 0,001 N.	
<u>Reagente di Rivelazione II (RII)</u>	1 x 240 ml
Iodossido di sodio 1N.	

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Adottare le normali precauzioni durante l'esecuzione di questo test (4).
- C. Il test è riservato esclusivamente all'identificazione del *M. avium* isolato a partire da una coltura.
- D. Usare esclusivamente 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 tubature e formare composti esplosivi. Durante l'eliminazione di tali reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti all'interno delle tubature.
- G. Evitare qualsiasi contatto della cute, degli occhi o delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. 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 nelle loro confezioni di alluminio a temperature comprese tra 2° e 8°C. Prima dell'apertura, la loro stabilità è assicurata 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. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA possono essere conservati a temperature comprese fra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA è stato progettato e sviluppato per identificare l'*M. avium* isolato a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su terreni solidi adeguati, come un terreno di coltura agar di Löwenstein-Jensen o terreni di coltura Middlebrook 7H10 o 7H11 quando si osserva una morfologia che può far pensare al *M. avium*. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione o 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 su brodo di coltura.** 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 un campione da 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. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA
(bioMérieux cod. 39002 / Gen-Probe Cat. N. 102835/2835)

20 Test

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

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

Ansa 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

McFarland 1 Nephelometer Standard

*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)

Sonicatori GEN-PROBE

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

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE

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

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

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

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)
Portaprovette per il sonicatore GEN-PROBE
(bioMérieux cod. 39313 / Gen-Probe Cat. N. 104027/4027)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. L'acqua del bagno ad ultrasuoni deve essere perfettamente degassificata prima della manipolazione per ottimizzare il trasferimento energetico degli ultrasuoni. A questo fine attenersi alle istruzioni sotto indicate:
 - a. Riempire il serbatoio del sonicatore con acqua calda fino a circa 1 cm dal bordo.
 - b. Per degassificare completamente l'acqua far funzionare il sonicatore per 15 minuti.
2. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o un altro incubatore o sistema a bagnomaria a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
3. 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. avium* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 25291) come controllo positivo ed una coltura di *M. intracellulare* (ATCC 13950) 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 (Tampone di Ibridazione) in tutte le Provette di Lisi. **Se il test viene eseguito su ceppi isolati a partire da brodo 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 completamente omogeneizzato nelle Provette di Lisi, attenendosi alle istruzioni fornite nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Se il test viene eseguito su una coltura in terreno solido, 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 il Vortex.

D. LISI DEL CAMPIONE

1. Inserire le Provette di Lisi nel portaprovette del sonicatore di modo che la miscela di reagente presente sul fondo della provetta sia completamente immersa, 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 fermandola 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 µl 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 µl 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 giusto sul luminometro.
2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugarle utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire successivamente le provette nel luminometro e seguire 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 dipendono dal tempo. 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 altresì 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. intracellulare* ATCC 13950), 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 agarizzato e metterla ad incubare.
2. Bassi valori di controllo positivo (*M. avium*, ATCC 25291), 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 troppo vecchie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agarizzato e metterla ad incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA vengono interpretati in base ad un valore soglia. I campioni che producono un segnale luminoso di valore superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia sono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona intorno al cut-off, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi fa nuovamente emergere risultati equivoci, occorre trapiantare il ceppo per verificarne la purezza.

	ACCULDR (precedentemente PAL)	LEADER
Valore limite	900 PLU	30.000 RLU
cut-off	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *M. intracellulare*, ATCC 13950) e positivi (ad es. *M. avium*, ATCC 25291) devono soddisfare i seguenti valori:

	ACCULDR (precedentemente PAL)	LEADER
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 liquidi elencati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente sui campioni clinici (urinari, coprologici o respiratori) non sono state valutate.

I risultati del test ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati del laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

IL TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di colture con identificazione biochimica su tre centri. Sono stati testati 120 ceppi di *M. avium* e 220 ceppi di altre 25 specie di micobatteri. Sul centro 1 è stata impiegata la tecnica GLC (cromatografia gas-liquido) oltre all'identificazione tradizionale su coltura. L'identificazione su coltura dipende dal tasso di accrescimento e si basa sullo studio della morfologia delle colonie, sull'esame microscopico e su una serie di reazioni biochimiche. D'altronde, il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con la tecnica HPLC sul centro 4, su un totale di 97 ceppi di micobatteri. Sono stati identificati mediante HPLC 30 ceppi di *M. avium*, 31 ceppi di *M. intracellulare* e 36 ceppi di altre 12 specie di micobatteri. Il test ha permesso di classificare le colture positive (≥ 30.000 RLU) e negative (< 30.000 RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 206 e 11.434 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi fra 52.151 e 739.861 RLU. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato.

ACCUPROBE /COLTURA, GLC, HPLC IDENTIFICAZIONE

	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Centro 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Centro 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Centro 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Totale	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Un ceppo di *M. avium* ACCUPROBE negativo e HPLC positivo è stato testato di nuovo ed ha evidenziato un risultato fortemente positivo con il TEST ACCUPROBE per l'identificazione del *M. Avium* a partire da coltura.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

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

Mycobacterium avium

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	25.738	47.730
Deviazione standard	445	668
Coefficiente di variazione	1,7%	1,4%

B. PRECISIONE INTER-TEST

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

Mycobacterium avium

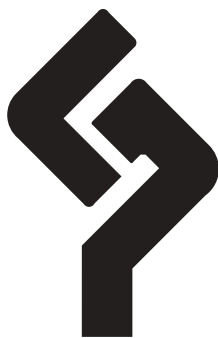
Campione	A	B
Numero di test	12	12
Risposta media	27.929	50.418
Deviazione standard	1.465	2.833
Coefficiente di variazione	5,2%	5,6%

C. SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 114 colture ATCC tramite il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA. Questi ceppi comprendevano 92 specie provenienti da 41 generi diversi. Sono stati testati un pannello filogenetico di 16 ceppi del *M. avium*, 49 ceppi di altre 28 specie di micobatteri e 65 colture di altri 40 generi. Unicamente i ceppi di *M. avium* testati hanno evidenziato un risultato positivo con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Diluizioni di RNA ribosomiale di *M. avium* le cui concentrazioni erano comprese fra 5×10^{-4} µg e 1×10^{-1} µg per test sono state analizzate in presenza di 30 milioni di microrganismi appartenenti a una delle seguenti specie: *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* o *Nocardia asteroides*. Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL M. AVIUM ISOLATO DA UNA COLTURA.





AccuProbe

MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

UTILIZAÇÃO

O ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *Mycobacterium avium* isolado de uma cultura.

INTRODUÇÃO

Mycobacterium avium (*M. avium*) faz parte do complexo *Mycobacterium avium* (complexo *M. avium*) que agrupa um certo número de organismos cujas relações taxonómicas são mal conhecidas e controversas, mas cujo papel patogénico no homem é inquestionável (16). Nos pacientes imunodeprimidos, a infecção por *M. avium* provoca uma doença grave (12). O tratamento desta infecção é difícil e a sua gravidade necessita de uma diagnóstico rápido. Além disso, alguns laboratórios identificam em rotina, pelo menos, tantas estirpes do complexo *M. avium* quantas as *M. tuberculosis*.

Os métodos clássicos de identificação das micobactérias assentam na detecção de bacilos ácido-álcool-resistentes por coloração de Ziehl-Nielsen, seguida de cultura e de análise bioquímica. Podem ser necessários dois meses para a identificação de isolados de *Mycobacterium* usando estes dois métodos (8).

Admite-se geralmente que o complexo *M. avium* engloba duas espécies: *M. avium* e *M. intracellulare*. Os fenótipos de *M. avium* e *M. intracellulare* são praticamente idênticos e os testes bioquímicos não permitem diferenciá-los.

M. avium e *M. intracellulare* podem ser identificados por High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (3), no entanto, este método exige muito tempo e está disponível em poucos laboratórios.

A análise serológica também foi efectuada para diferenciar as estirpes de *M. avium* e *M. intracellulare*, usando soros α -antigénicos que podem ser úteis nos estudos epidemiológicos. No entanto, a serotipagem é limitada a algumas aplicações e tem pouco interesse no seguimento dos pacientes. Actualmente considera-se que existem 28 serotipos no complexo *M. avium* e ao longo do tempo os diferentes serotipos foram atribuídos às espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. Assim, durante muito tempo considerava-se que os serotipos 1 a 3 pertenciam a *M. avium*, enquanto que os serotipos 4 a 28 pertenciam a *M. intracellulare* (15).

Em vários estudos, Baess utilizou a técnica de hibridização ADN : ADN para tentar clarificar as relações taxonómicas entre estas duas espécies. Segundo os resultados destas análises, concluiu que os serotipos 4, 5, 6 e 8, anteriormente classificados como *M. intracellulare*, pertenciam na realidade à espécie *M. avium*. O estatuto do serotipo 9 nunca ficou resolvido (1, 2).

Saito et al, utilizando também a tecnologia das sondas de ADN propuseram atribuir novamente os 28 serotipos da seguinte forma: os serotipos 1 a 6, 8 a 11 e 21 pertenceriam a *M. avium*; os serotipos 7, 12 a 20 e 25 pertenceriam a *M. intracellulare*, os serotipos 22 a 28 (excepto para o serotipo 25) foram considerados heterogéneos, não puderam ser atribuídos a nenhuma destas espécies (13). Para além destas, algumas estirpes não puderam ser determinadas e algumas aglutinaram com vários anti-soros.

Outros relatórios utilizando sondas de ADN para a identificação das espécies do complexo *Mycobacterium avium* foram publicados, incluindo a utilização de sondas ADN para estudos epidemiológicos e análise da distribuição geográfica de *M. avium* e *M. intracellulare* (5-7, 9, 11, 14).

O ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA identifica *M. avium* isolado de uma cultura em menos de uma hora. A identificação baseia-se na detecção de sequências de ARN ribossómico específicas de *M. avium*. O ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA permite uma identificação rápida, objectiva e precisa de *M. avium* isolado de uma cultura.

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 (10). O método ACCUPROBE utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar de ARN ribossómico (ARNr) do organismo alvo. Quando o ARN do organismo alvo é libertado, a sonda hibridiza com este para formar um complexo ADN - ARN estável. O Reagente de Selecção permite diferenciar as sondas hibridizadas das não-hibridizadas. O luminómetro GEN-PROBE mede o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são fornecidos em três embalagenkits distintos:

ACCUPROBE SONDA PARA M. AVIUM

<u>Probe Reagent (Reagente Sonda) (P)</u> <i>Mycobacterium avium</i> .	(4 x 5 tubos)
<u>Lysing Reagent (Reagente de Lise) (LT)</u> Esferas de vidro e tampão.	(1 x 20 tubos)

ACCUPROBE DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

<u>Reagente 1</u> (Reagente de Lise/Lysis Reagent) (1) Solução tampão contendo 0,04% de azida sódica.	1 x 10 ml
<u>Reagente 2</u> (Tampão de Hibridização/Hybridization Buffer) (2) Solução tampão.	1 x 10 ml
<u>Reagente 3</u> (Reagente de Selecção/Selection Reagent) (3) Solução tampão.	1 x 60 ml

KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

Reagente de Detecção Detection Reagent I (RI)	1 x 240 ml
0,1% peróxido de hidrogéneo em 0,001 N ácido nítrico.	
Detection Reagente de Detecção II (RII)	1 x 240 ml
1 N hidróxido de sódio.	

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Unicamente para diagnóstico *in vitro*.
- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (4).
- C. Utilizar unicamente para a identificação das micobactérias do complexo *M. avium* isoladas de uma 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 desta embalagem 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. 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. Depois da abertura, a saqueta deve ser bem fechada e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes de ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM 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 AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi concebido para identificar *Mycobacterium avium* 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 Lowenstein-Jensen, ou em meios de Middlebrook 7H10 ou 7H11, quando se observar uma morfologia que evoca *M. avium*. A amostra pode ser analisada logo que a proliferação seja visível e durante os sessenta 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 uma vez que as micobactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade mínima de líquido.
 2. Evitar colher parte do meio sólido de cultura.
 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 com culturas em caldo de Middlebrook 7H9 que possuam uma turbidez superior ou igual a 1 McFarland. Pipetar uma amostra de 100 µl da suspensão do caldo correctamente homogeneizado, para o Tubo de Lise, seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

MATERIAL FORNECIDO

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA
(bioMérieux ref. 39002 / Gen-Probe Cat. No. 102835/2835)

20 Testes

Reagente Sonda (P)	4 x 5 tubos
Reagente 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)

Sonicador GEN-PROBE

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

ACCUPROBE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA

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

REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

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

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°/95° ± 1°C)

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

Suporte de tubos para o sonicador GEN-PROBE

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

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Encher o reservatório do sonicador com água quente até cerca de 1 cm do bordo.
 - a. A água do banho de ultrasons deve estar perfeitamente desgaseificada antes da manipulação para otimizar a transferência de energia dos ultrasons.
 - b. Para desgaseificar completamente a água, colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
2. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e um outro a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
3. Preparar o luminómetro GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar todos 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. avium* (por exemplo, American Type Culture Collection, ATCC #25291) como controlo positivo, e uma cultura de *M. intracellulare* (por exemplo, ATCC #13950) como controlo negativo.

C. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

1. Identificar um número suficiente de Tubos de Lise para analisar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
2. Pipetar 100 μl de Reagente 1 (Reagente de Lise) e 100 μl 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 μl do caldo de cultura correctamente homogeneizado para o Tubo de Lise correspondente, seguindo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou a agulha na solução para colocar as células em suspensão.
4. Fechar os tubos de Lise e agitá-los rapidamente 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 dos tubos no sonicador. 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 contêm 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 bem a saqueta dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com um clip. **Não retirar a saqueta que contém o dissecante.**

2. Identificar um número suficiente de tubos de Reagente Sonda para testar as amostras e/ou as estirpes de controlo. Tirar e conservar as tampas.
3. Pipetar 100 µl da amostra lisada dos Tubos de Lise para os tubos de Reagente Sonda correspondentes.
4. Fechar os Tubos de Reagente Sonda e colocá-los em incubação durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em 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 µl 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 num bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. **Ler os resultados no luminómetro durante 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 e seguir as instruções.
3. Quando a análise tiver terminado, retirar os tubos do luminómetro.

NOTAS

- A. REAGENTES: O Reagente 2 (Tampão de Hibridização) pode precipitar. Aquecê-lo a $35^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$ e agitá-lo para dissolver o precipitado.
- B. TEMPERATURA: A hibridização e a Selecção são reacções termodependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES: as reacções de Hibridização e de Selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de 6 minutos.
- D. BANHO-MARIA: a água deve estar ao nível do anel de fecho dos tubos de Lise, não acima. Certificar-se de que a totalidade 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. intracellulare*, ATCC #13950), 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 ver-

- ificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
- Podem observar-se valores fracos de controlo positivo (*M. avium*, ATCC #25291) inferiores a 30.000 RLU no LEADER ou a 900 PLU no ACCULDR (anteriormente PAL) se o número de microrganismos 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 de ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido.

	ACCULDR (anteriormente PAL)	LEADER
Valor limiar	900 PLU	30.000 RLU
Zona duvidosa	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROLO DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

O controlo negativo (por exemplo, *M. intracellulare*, ATCC #13950) e o positivo (por exemplo, *M. avium*, ATCC #25291) devem estar dentro dos seguintes valores:

	ACCULDR (anteriormente PAL)	LEADER
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 no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. O comportamento funcional deste teste praticado directamente com amostras clínicas (por exemplo, urinárias, coprológicas ou respiratórias) não foi avaliado.

Os resultados de ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA devem ser interpretados conjuntamente com outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

O ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura em quatro locais (local 1, 2, 3 e 4), utilizando 120 estirpes de *Mycobacterium avium* e 220 estirpes de 25 outras espécies de *Mycobacterium*. A técnica de GLC (Gas Liquid Chromatography) foi utilizada no Local 1 para além da identificação tradicional em cultura. A identificação em cultura depende da taxa de crescimento e baseia-se no estudo da morfologia das colónias, no exame microscópico e numa série de reacções bioquímicas. Adicionalmente, o TESTE ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi comparado com a técnica High Performance Liquid Chromatography (HPLC) no Local 4 usando um total de 97 estirpes *Mycobacterium*. HPLC

identificou 30 estirpes como *Mycobacterium avium*, 31 estirpes como *Mycobacterium intracellulare*, e 36 estirpes como 12 outras espécies de *Mycobacterium*. Utilizando o ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA todas as estirpes foram determinadas como positivas (≥ 30.000 RLU) ou negativas (< 30.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 206 e 11.434 RLU e as culturas positivas deram resultados compreendidos entre 52.151 e 739.861 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação, GLC (Local 1) e HPLC (Local 4) figuram de seguida.

ACCUPROBE /IDENTIFICAÇÃO DA CULTURA, GLC, HPLC

	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	Taxa de Concordância
Local 1	64	0	0	57	100%/100%	100%
Local 2	5	0	0	116	100%/100%	100%
Local 3	51	0	0	47	100%/100%	100%
Local 4	29	0	1	67	96,7%/100%	99,0%
Total	149	0	1	287	99,3%/100%	99,8%

Uma estirpe de *M. avium* ACCUPROBE-negativa e HPLC-positiva foi novamente testada e deu um resultado fortemente positivo com o ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.

PERFORMANCES COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *M. avium* 10 vezes numa mesma série.

Mycobacterium avium

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média	25.738	47.730
Desvio-padrão	445	668
Coefficiente de Variação	1,7%	1,4%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio do ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA foi calculada analisando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *M. avium*, 12 vezes numa mesma série.

Mycobacterium avium

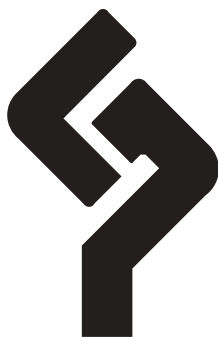
Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média	27.929	50.418
Desvio-padrão	1.465	2.833
Coefficiente de variação	5,2%	5,6%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 114 estirpes de culturas ATCC com ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA. Estas estirpes compreendiam 92 espécies provenientes de 41 géneros diferentes. Foi testado um painel filogenético de 16 estirpes de *M. avium*, 49 estirpes de 28 outras espécies e 65 estirpes de 40 outros géneros. Apenas as estirpes de *M. avium* deram resultados positivos com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MYCOBACTERIUM AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA. As outras espécies de *Mycobacterium* representando cruzamentos filogenéticos não reagiram com este dispositivo.


D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas diluições de ARN ribossómico proveniente de *M. avium* cujas concentrações estavam compreendidas entre $5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ e $1 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ por teste na presença de 30 milhões de microrganismos de *M. intracellulare*, *M. tuberculosis* ou de *Nocardia asteroides*. Não foi detectada nenhuma interferência nem reacção cruzada com o ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA.



BIBLIOGRAPHY BIBLIOGRAPHIE LITERATUR BIBLIOGRAFIA

1. **Baess, I.** 1983. Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *M. avium*, *M. avium* and *M. scrofulaceum*. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. **91**:201-203.
2. **Baess, I.** 1979. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. **87**:221-226.
3. **Butler, W. R., and J. O. Kilburn.** 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *M. gordonae* by high performance liquid chromatography of their mycolic acids. J. Clin. Microbiol. **26**:50-53.
4. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**:377-382, 387-388.
5. **Drake, T. A., J.A. Hindler, G. W. Berlin, and D. A. Bruckner.** 1987. Rapid identification of *M. avium* complex in culture using DNA probes. J. Clin. Microbiol. **25**:1442-1445.
6. **Ellner, P. D., T. E. Kiehn, R. Cammarata, and M. Hosmer.** 1988. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J. Clin. Microbiol. **26**:1349-1352.
7. **Gonzalez, R. and B.A. Hanna.** 1987. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **8**:69-77
8. **Kent, P. T. and G. P. Kubica.** 1985. Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory, U. S. Department of Public Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
9. **Kiehn, T. E. and F. F. Edwards.** 1987. Rapid identification using a specific DNA probe of *M. avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. **25**:1551-1552.
10. **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.
11. **Musial, C. E., L. S. Tice, L. Stockman, and G. D. Roberts.** 1988. Identification of Mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *M. avium* complex and *M. tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. **26**:2120-2123.
12. **Pitchenik, A. E., D. Fertel, and A. B. Block.** 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. Clin. Chest. Med. **9**:425-441.
13. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, and D. Dawson.** 1990. Identification of various serovar strains of *M. avium* and *M. intracellulare*. J. Clin. Microbiol. **28**:1694-1697.
14. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, M. Tsukamura, F. Kuze and K. Asano.** 1989. Identification and partial characterization of *M. avium* and *M. intracellulare* by using DNA probes. J. Clin. Microbiol. **27**:994-997.
15. **Schaefer, W. B.** 1965. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Respir. Dis. **92**(Suppl.): 85-93.
16. **Sommers, H. M. and R. C. Good.** 1985. M., p. 216-248. In E. H. Lennette, *et al.* (ed.) Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



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



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

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

102899F-01 Rev. D 2011-03
©1990 - 2011 Gen-Probe Incorporated