



AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE
IDENTIFICATION TEST**

(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat. No. 102845/2845)

**MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEX
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**

(bioMérieux Best.Nr. 39001 / Gen-Probe Kat. Nr. 102845/2845)

**TEST D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE
M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE**

(bioMérieux réf. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)

**TEST DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM
AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO**

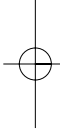
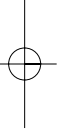
(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)

**TEST D'IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX
ISOLATI A PARTIRE DA CULTURA**

(bioMérieux cod. 39001 / Gen-Probe Cat. N. 102845/2845)

**TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO
M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA**

(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)





AccuProbe

English

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST

FOR EXPORT USE ONLY

(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat. No. 102845/2845)

INTENDED USE

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

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Infections caused by members of the *M. avium* complex are the most common mycobacterial infections associated with AIDS and other immunocompromised patients (7, 15). The incidence of *M. avium* complex as a clinically significant pathogen in cases of chronic pulmonary disease is also increasing (8, 17). Recently, several laboratories have reported that the frequency of isolating *M. avium* complex is equivalent to or greater than the frequency of isolating *M. tuberculosis* (17). The treatment of these infections is difficult and the severity of the infection requires rapid diagnosis.

The *M. avium* complex consists of those slowly growing mycobacteria that produce little or no pigment, do not hydrolyze TWEEN 80 or urea, do not reduce nitrate, produce less than 45 mm foam in the semiquantitative catalase test, and produce positive reactions for nicotinamidase and pyrazinamidase. The complex is generally divided into two species, *M. avium* and *M. intracellulare* (19). Phenotypically these organisms are virtually indistinguishable and biochemical tests are unable to differentiate between them.

Methods that have commonly been used for identifying an isolate as a member of the *M. avium* complex have included cultural and biochemical procedures, serotyping, gas liquid chromatography, high performance liquid chromatography (HPLC), and isotopically labeled DNA probes that react with ribosomal RNA (GEN-PROBE Rapid Diagnostic System for the MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Furthermore, most strains of the *M. avium* complex may be identified as either *M. avium* or *M. intracellulare* by serotyping with adsorbed sera containing specific antibodies to cell surface antigens. However, recent studies on T-catalase, restriction fragment length polymorphisms, and DNA-DNA hybridization have demonstrated that some serovars formerly thought to be *M. intracellulare* actually belong to the species *M. avium* (1, 14, 21).

However, there are a small number of biochemically determined *M. avium* complex isolates that cannot be reliably speciated by any of the above methods as either *M. avium* or *M. intracellulare*. The exact taxonomic status of such strains is currently uncertain. The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST has been designed to detect, *M. avium*, *M. intracellulare*, and other isolates more recently identified as belonging to the *M. avium* complex. It does not differentiate between the species within the complex (20, 22, 23). Rare isolates of the *M. avium* complex may not produce a positive reaction in this test.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (4). The ACCUPROBE SYSTEM uses a single-stranded DNA probe with a chemiluminescent label that is complementary to the ribosomal RNA of the target organism. After the ribosomal RNA is released from the organism, the labeled DNA probe combines with the target organism's ribosomal RNA to form a stable DNA:RNA hybrid. The Selection Reagent allows for the differentiation of non-hybridized and hybridized probe. The labeled DNA:RNA hybrids are measured in a GEN-PROBE luminometer. A positive result is a luminometer reading equal to or greater than the cut-off. A value below this cut-off is a negative result.

REAGENTS

Reagents for the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST are provided in three separate reagent kits:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX PROBE KIT

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

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

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

GEN-PROBE DETECTION REAGENT KIT

<u>Detection Reagent I</u> (RI)	1 x 240 mL
0.1% hydrogen peroxide in 0.001 N. nitric acid	
<u>Detection Reagent II</u> (RII)	1 x 240 mL
1 N sodium hydroxide	

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal precautions when performing this assay (2).
- C. Use only for the identification of *M. avium* complex isolated from culture.
- D. Use only supplied or specified disposable laboratory ware.
- E. Culture handling and all procedural steps through the heat inactivation step should be performed in a Class II Biological Safety Cabinet.
- F. Reagents in this kit contain sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Upon disposal of these reagents, always dilute the material with a large volume of water to prevent azide buildup in the plumbing.
- G. Avoid contact of Detection Reagents I and II with skin and mucous membranes. Wash with water if these reagents come into contact with skin. If spills of these reagents occur, dilute with water before wiping dry.

STORAGE AND HANDLING REQUIREMENTS

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

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

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

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

MATERIALS PROVIDED

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST
bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat. No. 102845/2845

	<u>20 tests</u>
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 1/2 inch of the top of the tank.
 - b. Run the sonicator for 15 minutes to thoroughly degas the water.
2. Adjust one heating block or water bath to 60° ± 1°C and another heating block or water bath to 95° ± 5°C.
3. Prepare the GEN-PROBE LEADER 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 *Mycobacterium avium* (e.g. American Type Culture Collection, ATCC #25291) or *Mycobacterium intracellulare* (e.g., ATCC #13950) may be used as the positive control while a culture of *Mycobacterium tuberculosis* (e.g., ATCC #25177) 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 precipitate.
- B. **TEMPERATURE:** The Hybridization and Selection reactions are temperature dependent. Therefore, it is imperative that the water bath or heat 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 homogeneous mixture during the SAMPLE PREPARATION and SELECTION Steps, specifically after the addition of cells to Reagents 1 and 2 and after addition of Reagent 3.
- F. TROUBLE-SHOOTING
1. Elevated negative control values (M tuberculosis ATCC #25177) greater than 10,000 RLU (Relative Light Units) in the LEADER or 300 PLU (Photometric Light Units) in the ACCULDR (formerly PAL) can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
 2. Low positive control values (*M. avium* ATCC #25291 or Mycobacterium intracellulare ATCC #13950) 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 COMPLEX 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. If repeat testing yields equivocal results, then the isolate should be subcultured to verify its purity.

	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. tuberculosis*, ATCC #25177) and positive control (e.g., *M. avium*, ATCC #25291), whether from broth culture or solid media, should satisfy the following values:

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

If the positive control or negative control values are not in the required range, the test results must not be reported.

LIMITATIONS

This method has been tested using fresh growth from solid media and from broth 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).

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST does not differentiate between members of the *M. avium* complex. Isolates of either species will be identified as *M. avium* complex.

There are a small number of biochemically determined *M. avium* complex isolates that cannot be differentiated by serology or HPLC methods as either *M. avium* or *M. intracellulare*. Some of these strains also may not be detected by the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. The exact taxonomic status of such strains is at present uncertain. The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies *M. avium* complex strains that belong to this complex based on traditional biochemical methods HPLC or GLC procedures. ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST may detect unusual *M. avium* complex strains, the clinical significance of which is not well established. Results from the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

EXPECTED VALUES

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard biochemical culture identification methods at three sites. Site 1 was Gen-Probe Incorporated; Sites 2 and 3 were Reference Laboratories. Seven hundred seventeen *M. avium* complex isolates (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare*, and 624 *M. avium* complex) and 235 strains of other Mycobacterium strains representing 22 species were tested. The isolates were categorized as either positive (> 30,000 RLU) or negative (< 30,000 RLU). The range of observations for negative cultures was 1,353 to 14,675 RLU and 30,829 to 2,742,691 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

ACCUPROBE / STANDARD BIOCHEMICAL PROCEDURES

ACCUPROBE Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Site 2	146	0	1	102	99.3%/100%	99.6%
Site 3	526	0	17	74	96.9%/100%	97.2%
Total	716	0	18	223	97.6%/100%	98.1%

Upon Discrepant Resolution

ACCUPROBE / STANDARD BIOCHEMICAL PROCEDURES

ACCUPROBE Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Site 2	146	0	1	102	99.3%/100%	99.6%
Site 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Total	716	0	2	235	99.9%/100%	99.9%

The one discrepant sample at the site 2 (2416) was analyzed by the CDC, Atlanta, Georgia, and was identified as an *M. avium* complex by HPLC analysis. The drug susceptibility pattern of this organism was unusual for a member of the *M. avium* complex, and biochemical results were also atypical.

Site 3 had 17 original discrepant. Two of these discrepant (7755, 5113) were misidentified and have been re-identified by HPLC and GLC as *M. nonchromogenicum*. Three cultures were deleted from the study because two were mixed (4750, 8168), and one culture was no longer viable (0601). Two other cultures

were deleted from the study because they could not be definitively identified as belonging to the MAC: 2344 and 5124 are identified as “most closely resembles MAC.” HPLC results on seven of the ten remaining discrepant were received from the CDC, Atlanta, Georgia. Strains PE09 and 6458 were identified as *M. xenopi* 2, while 9714 and 8310 were identified as *M. terrae* complex. Discrepant 1264 and 3634 were identified as *M. scrofulaceum* by the CDC based on their HPLC patterns. Strain 1264 exhibited pattern SC007 while strain 3634 showed pattern EM002.

Strain 0214 was identified as *M. simiae*, while 8153 has been confirmed as a MAIS HPLC pattern EM005. Isolates 2888 and 2971 were identified as “unidentified scotochromogen.” Members of the *M. avium* complex are not scotochromogenic.

Thus, upon resolution, the overall sensitivity is 99.9%, specificity is 100%, and the percent agreement is 99.9%.

In a separate evaluation of 148 unusual MAC isolates referred to reference laboratories because of difficulties in identification, 120 reacted positively with the *M. avium* complex probe. Twenty-eight isolates produced negative results with the probe. These isolates are being further studied by the CDC. The taxonomic status of unusual *M. avium* complex isolates is also being reviewed by the International Working Group in Mycobacterial Taxonomy.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. WITHIN-RUN PRECISION

The within-run precision of the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST was calculated by assaying two concentrations of ribosomal RNA isolated from *M. avium*, *M. intracellulare* or non-*M. avium*, non-*M. intracellulare* *M. avium* complex using 12 replicates in a single assay.

Mycobacterium avium

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	67,574	112,246
Standard Deviation	2,900	3,429
Coefficient of Variation	4.3%	3.1%

Mycobacterium intracellulare

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	61,758	100,736
Standard Deviation	3,941	3,275
Coefficient of Variation	6.4%	3.3%

***M. avium* complex**

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	64,148	113,049
Standard Deviation	3,384	3,249
Coefficient of Variation	5.3%	2.9%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

The between-run precision was calculated by assaying the same two concentrations of *M. avium*, *M. intracellulare* non-*M. avium*, non-*M. intracellulare M. avium* complex ribosomal RNA using single determinations in 10 consecutive runs.

Sample	<i>Mycobacterium avium</i>	
	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	65,790	125,506
Standard Deviation	4,535	9,115
Coefficient of Variation	6.9%	7.3%

Sample	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	
	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	60,175	104,203
Standard Deviation	6,339	9,239
Coefficient of Variation	10.5%	8.9%

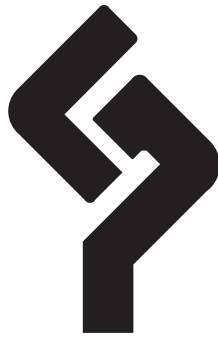
Sample	<i>M. avium</i> complex	
	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	64,187	111,197
Standard Deviation	4,659	10,011
Coefficient of Variation	7.3%	9.0%

C. SPECIFICITY

A total of 122 ATCC culture isolates were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 93 species from 37 genera. Three isolates of *M. avium* complex, 60 isolates of 55 other *Mycobacterium* species, and 59 isolates of 36 other genera representing a phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. Only *Mycobacterium avium* complex isolates tested produced a positive result using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST. Other *Mycobacterium* species and the representative phylogenetic cross-section isolates did not react in this test.

D. RECOVERY

M. avium, *M. intracellulare*, and *M. avium* complex ribosomal RNA, each at concentrations ranging from 2.5×10^{-3} mg to 4.0×10^{-2} mg per test was assayed in the presence of 15 million cells of either *Mycobacterium terrae*, *M. simiae*, or *Nocardia asteroides*. No interference of *M. avium* complex signal was observed and the other organisms present did not react using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST.



MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST

(bioMérieux Best.Nr. 39001 / Gen-Probe Kat. Nr. 102845/2845)

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Mykobakterien-Infektionen bei AIDS- oder anderen immunsupprimierten Patienten sind in der Mehrzahl der Fälle auf Mykobakterien des *M. avium* Komplexes zurückzuführen (7, 15). Ferner nimmt die Inzidenz von *M. avium* Komplex als klinisch relevanter Erreger auch bei chronischen Lungenerkrankungen zu (8, 17). Mehrere Laboratorien berichteten in letzter Zeit, daß sie *M. avium* Komplex mindestens ebenso häufig, wenn nicht häufiger als *M. tuberculosis* isolieren (17). Die Behandlung dieser Infektionen ist schwierig und die Schwere der Erkrankung erfordert eine rasche Diagnose.

Der *M. avium* Komplex besteht aus den langsam wachsenden Mykobakterien, die wenig oder kein Pigment bilden, TWEEN 80 oder Harnstoff nicht hydrolysieren, Nitrat nicht reduzieren, im halbquantitativen Katalase-Test weniger als 45 mm Schaum erzeugen und Nicotinamidase- und Pyrazinamidase-positive Reaktionen hervorrufen. Der Komplex wird im allgemeinen in zwei Spezies eingeteilt: *M. avium* und *M. intracellulare* (19). Phänotypisch sind diese beiden Mikroorganismen praktisch nicht zu unterscheiden und über biochemische Tests ist keine Differenzierung möglich.

Im allgemeinen wurden für den Nachweis von Mykobakterien des *M. avium* Komplex kulturelle und biochemische Verfahren, die Serotypisierung, die GLC (gas liquid chromatography), die HPLC (high performance liquid chromatography) sowie Verfahren mit isotopisch markierten DNA-Sonden, die mit ribosomaler RNA reagieren (GEN-PROBE Schnelltest für den *M. avium* Komplex) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18) verwendet. Darüber hinaus können die meisten Stämme des *M. avium* Komplex durch Serotypisierung mit adsorbierten Seren, die spezifische Antikörper gegen Zelloberflächenantigene enthalten, entweder als *M. avium* oder *M. intracellulare* identifiziert werden. Neuere Studien zu T-Katalase, Restriktionslängenpolymorphismus und DNA-DNA-Hybridisierung haben jedoch gezeigt, daß einige Serotypen, die man früher *M. intracellulare* zuordnete, tatsächlich zur Spezies *M. avium* gehören (1, 14, 21).

Es gibt jedoch eine geringe Anzahl von biochemisch identifizierten *M. avium* Komplex Stämmen, die von keiner der oben genannten Methoden sicher als *M. avium* oder *M. intracellulare* spezifiziert werden können. Der genaue taxonomische Status dieser Stämme ist noch unklar.

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST weist *M. avium* und *M. intracellulare* nach sowie andere Stämme, die in jüngster Zeit dem *M. avium* Komplex zugeordnet wurden. Er ermöglicht keine Differenzierung innerhalb des Komplexes (20, 22, 23). Einige seltene Isolate aus dem *M. avium* Komplex ergeben kein positives Testergebnis.

PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (4). Der ACCUPROBE Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemiluminiszenzmarker 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 Chemiluminiszenzmarker 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 KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS werden in drei separaten Kits geliefert:

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEX SONDEN-TESTKIT

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

ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENTKIT

<u>Reagenz 1</u> (Lyserieagenz) (1)	1 x 10 ml
Pufferlösung mit 0,04% Natriumazid	
<u>Reagenz 2</u> (Hybridisierungspuffer) (2)	1 x 10 ml
Pufferlösung	
<u>Reagenz 3</u> (Selektionsreagenz) (3)	1 x 60 ml
Pufferlösung	

GEN-PROBE DETEKTIONS-REAGENZIENTKIT

<u>Detektionsreagenz I</u> (RI)	1 x 240 ml
0,1% Wasserstoffperoxid in 0,001 N Salpetersäure	
<u>Detektionsreagenz II</u> (RII)	1 x 240 ml
1 N Natriumhydroxyd	

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (2).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von Mykobakterien des *M. avium* Komplex aus der Kultur.
- 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 oder den Schleimhäuten. Bei eventuellem Kontakt sofort mit Wasser spülen. Beim Verschütten einer dieser Reagenzien, die Flüssigkeit vor dem Aufwischen mit Wasser verdünnen.

LAGERUNG

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

Die übrigen Reagenzien des ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *M. avium* Komplex aus der Kultur.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Medien (z.B. Löwenstein Jensen Schrägagar oder Middlebrook 7H10 oder 7H11 Medien) angezüchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um Bakterien des *M. avium* Komplex handelt. Sie können die Kulturen testen, sobald Wachstum sichtbar wird oder während der folgenden 60-tägigen Inkubationszeit.
1. Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Mykobakterien anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Kultur kein Nährboden mit abgenommen wird.
 3. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.
- B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit Middlebrook 7H9 Bouillonkulturen durchgeführt werden, deren Trübung gleich oder größer ist als McFarland Standard 1. Pipettieren Sie 100 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in ein Lyseröhrchen, wie im Abschnitt PROBENVORBEREITUNG beschrieben.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST
bioMérieux Best.Nr. 39001 / Gen-Probe Kat. Nr. 102845/2845

	<u>20 Tests</u>
Sondenreagenz (P)	4 x 5 Röhrchen
Lysereagenz (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 REAGENZKIT KULTURBESTÄTIGUNG

(bioMérieux Best.Nr. 39305 / Gen-Probe Kat. Nr. 102800/2800)

GEN-PROBE DETEKTIONS-REAGENZKIT

(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. No. 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 gründlich entgast werden:
 - a. Füllen Sie hierfür das Ultraschallbad bis ca. 1 cm unter den Rand mit heißem Wasser.
 - b. Schalten Sie das Ultraschallbad für 15 min ein, um das Wasser gründlich zu entgasen.
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 positive Kontrolle kann eine *Mycobacterium avium* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 25291) oder eine *Mycobacterium intracellulare* Kultur (z.B. ATCC 13950) dienen, während als negative Kontrolle eine *Mycobacterium tuberculosis* Kultur (z.B. ATCC 25177) verwendet werden kann.

C. PROBENVORBEREITUNG

1. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Lyseröhrchen für die Kulturoisolate 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 aus Reagenz 1 und Reagenz 2, so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden.

4. Lyseröhrchen gut verschließen und kurz Vortexen.

D. LYSIEREN DER PROBEN

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

E. HYBRIDISIERUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Proben und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenröhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenröhrchen für die Kulturproben und/oder die Kontrollen. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf.
3. Pipettieren Sie 100 μl der lysierten Proben aus den Lyseröhrchen in die entsprechenden Sondenröhrchen.
4. Verschließen Sie die Sondenröhrchen und inkubieren Sie diese für 15 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder Heizblock.

F. SELEKTION

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

G. DETEKTION

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

HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

- A. REAGENZIEN: Das Reagenz 2 (Hybridisierungspuffer) kann präzipitieren. Zur Auflösung des Niederschlags das Reagenz auf 35° - 60°C erhitzen und mischen.
- B. TEMPERATUR: Die Hybridisierung und Selektion sind temperaturabhängige Reaktionen. Es muß deshalb unbedingt darauf geachtet werden, daß der Heizblock und das Wasserbad im angegebenen Temperaturbereich gehalten werden.
- C. REAKTIONSDAUER: Die Hybridisierung und Selektion sind zeitabhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenröhrchen während des SELEKTIONSSCHRITTES mindestens 5 min, jedoch nicht länger als 6 min inkubieren.
- D. WASSERBAD: Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so daß die Röhrchen mit dem Lysereagenz bis zum Dichtungsring ins Wasser reichen, jedoch nicht darüber hinaus. Achten Sie 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. tuberculosis* ATCC 25177) über 10.000 RLU (Relative Light Units) durch unzureichendes Mischen nach der Zugabe von Reagenz 3 (Selektionsreagenz) entstehen. Entsprechendes gilt bei Messungen mit dem ACCULDR (vormals PAL), wenn dort erhöhte negative Kontrollwerte über 300 PLU (Photometric Light Units) gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt kann beim Testen von Mischkulturen auftreten. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Agarmedium überimpfen und inkubieren.
 2. Schwach positive Kontrollwerte (*M. avium* ATCC 25291 oder *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950) 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 M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST werden auf der Basis folgender Grenzwerte (cut-off) interpretiert. Ergebnisse, deren Lichtsignale dem Grenzwert entsprechen oder darüber liegen, werden als positiv bewertet. Lichtsignale unterhalb dieses Grenzwertes werden als negativ bewertet. Liegt das Ergebnis im Graubereich, sollte der Test wiederholt werden. Reagiert der Test wiederholt zweifelhaft, sollte eine Subkultur angelegt werden, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen.

	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 negative Kontrolle (z.B. *M. tuberculosis* ATCC 25177) und die positive Kontrolle (z.B. *M. avium* ATCC 25291), aus der Bouillonkultur oder von einem festen Medium, müssen folgenden Sollwerten entsprechen.

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

Liegen die Werte der positiven und negativen Kontrolle nicht innerhalb des Sollbereiches, können die Ergebnisse nicht validiert werden.

LIMITIERUNGEN

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

Der ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST differenziert nicht zwischen den einzelnen Spezies des *M. avium* Komplex, sondern identifiziert diese als *M. avium* Komplex.

Eine geringe Anzahl biochemisch identifizierter *M. avium* Komplex Stämme können weder serologisch noch durch HPLC als *M. avium* oder *M. intracellulare* differenziert werden. Einige dieser Stämme können auch nicht durch den ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST nachgewiesen werden. Der genaue taxonomische Status dieser Stämme ist derzeit noch unklar. Der ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert Stämme, die zum *M. avium* Komplex gehören und durch HPLC oder GLC als solche identifiziert wurden. Der ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST kann auch ungewöhnliche Stämme des *M. avium* Komplex nachweisen, deren klinische Bedeutung noch nicht genau bekannt ist.

Die Ergebnisse des ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 3 Laboratorien im Vergleich zu den klassischen Kulturverfahren mit biochemischer Identifizierung getestet. Labor 1 war ein Labor von Gen-Probe Incorporated, bei den Laboratorien 2 und 3 handelte es sich um Referenzlabors. 717 Stämme des *M. avium* Komplex (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare* und 624 *M. avium* Komplex) und 235 andere Mycobacterium Stämme, die 22 Spezies umfassten, wurden getestet. Die Stämme wurden entweder als positiv (> 30.000 RLU) oder negativ (< 30.000 RLU) eingeteilt. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 1.353 bis 14.675 RLU ermittelt, die Ergebnisse der positiven Kulturen lagen zwischen 30.829 und 2.742.691 RLU. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungs-methoden ist im folgenden angegeben.

ACCUPROBE / BIOCHEMISCHE STANDARDVERFAHREN

ACCUPROBE Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrelation
Labor 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Labor 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Labor 3	526	0	17	74	96,9%/100%	97,2%
Gesamt	716	0	18	223	97,6%/100%	98,1%

Nach Auflösung der diskrepanten Ergebnisse:

ACCUPROBE / BIOCHEMISCHE STANDARDVERFAHREN

ACCUPROBE Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrelation
Labor 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Labor 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Labor 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Gesamt	716	0	2	235	99,9%/100%	99,9%

Die einzige diskrepante Probe in Labor 2 (2416) wurde vom CDC, Atlanta, Georgia analysiert und mittels HPLC als Stamm des *M. avium* Komplex identifiziert. Sowohl das Antibiogramm als auch die biochemischen Reaktionen dieses Organismus waren für Stämme des *M. avium* Komplex untypisch.

Labor 3 hatte ursprünglich 17 diskrepante Resultate, von denen 2 falsch identifiziert worden waren (7755, 5113) und mittels HPLC und GLC als *M. nonchromogenicum* identifiziert wurden. 3 Kulturen, darunter zwei Mischkulturen (4750, 8168) und eine nicht mehr lebensfähige Kultur (0601) wurden aus der Studie genommen. 2 andere Kulturen wurden ebenfalls aus der Studie genommen, weil sie nicht definitiv als Stämme des *M. avium* Komplex identifiziert werden konnten. 2344 und 5124 wurden als "*M. avium* sehr ähnliche Stämme" identifiziert. 7 der verbleibenden 10 diskrepanten Ergebnisse wurden vom CDC mittels HPLC überprüft. Die Stämme PE09 und 6458 wurden als *M. xenopi* 2 identifiziert, die Stämme 9714 und 8310 als *M. terrae* Komplex. Die Stämme 1264 und 3634 wurden durch das CDC nach deren eigenen HPLC Profilen als *M. scrofulaceum* identifiziert. Stamm 1264 entsprach dem Profil SC007, der Stamm 3634 dem Profil EM002.

Stamm 0214 wurde als *M. simiae* identifiziert, während 8153 als Stamm mit einem MAIS HPLC Profil EM005 bestätigt wurde. Die Stämme 2888 und 2971 wurden als "nicht identifizierte scotochromogene Stämme" identifiziert. Stämme des *M. avium* Komplex sind nicht scotochromogen.

Somit beträgt die Gesamtsensitivität nach der Auflösung diskrepanter Ergebnisse 99,9%, die Spezifität 100% und die prozentuale Korrelation 99,9%. In einer separaten Studie wurden 148 atypische MAC-Stämme wegen der schwierigen Identifizierung erneut von Referenzlaboratorien getestet. 120 dieser Stämme reagierten mit der *M. avium* Sonde positiv. 28 Stämme reagierten mit der Sonde negativ und werden vom CDC weiter untersucht. Der taxonomische Status atypischer Stämme des *M. avium* Komplex wird ebenfalls von der International Working Group in Mycobacterial Taxonomy überprüft.

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE *M. AVIUM* KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden zwei Konzentrationen der rRNA von *M. avium*, *M. intracellulare* oder non-*M. avium*, non-*M. intracellulare* *M. avium* Komplex 12 Mal in einer Testserie bestimmt.

Mycobacterium avium

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert	67.574	112.246
Standardabweichung	2.900	3.429
Variationskoeffizient	4,3%	3,1%

Mycobacterium intracellulare

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert	61.758	100.736
Standardabweichung	3.941	3.275
Variationskoeffizient	6,4%	3,3%

M. avium Komplex

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert	64.148	113.049
Standardabweichung	3.384	3.249
Variationskoeffizient	5,3%	2,9%

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die gleichen zwei Konzentrationen der rRNA von *M. avium*, *M. intracellulare* non-*M. avium*, non-*M. intracellulare* *M. avium* Komplex in Einzelbestimmungen in 10 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Mycobacterium avium

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert	65.790	125.506
Standardabweichung	4.535	9.115
Variationskoeffizient	6,9%	7,3%

Mycobacterium intracellulare

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert	60.175	104.203
Standardabweichung	6.339	9.239
Variationskoeffizient	10,5%	8,9%

M. avium Komplex

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert	64.187	111.197
Standardabweichung	4.659	10.011
Variationskoeffizient	7,3%	9,0%

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 122 ATCC Kulturisolate mit dem ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Dabei handelte es sich um insgesamt 93 Spezies von 37 Gattungen. 3 Stämme des *M. avium* Komplex, 60 Stämme von 55 anderen Mycobacterium Spezies und 59 Stämme von 36 anderen Gattungen, die einen phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Nur Stämme des *Mycobacterium avium* Komplexes ergaben mit dem ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST ein positives Ergebnis. Andere Mycobacterium Spezies und die repräsentativen Stämme aus dem phylogenetischen Querschnitt reagierten nicht in diesem Test.

D. WIEDERFINDUNG

Es wurden *M. avium*, *M. intracellulare* und *M. avium* Komplex rRNA jeweils in Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-3}$ mg bis $4,0 \times 10^{-2}$ mg pro Test in Gegenwart von 15 Millionen Zellen getestet, die entweder zu *Mycobacterium terrae*, *M. simiae* oder *Nocardia asteroides* gehörten. Bei der Testung mit dem ACCUPROBE M. AVIUM KOMPLEX KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden keine Interferenzen oder Kreuzreaktionen festgestellt.



AccuProbe

TEST D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)

UTILISATION

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE est un test d'identification rapide par sonde ADN des mycobactéries du complexe *Mycobacterium avium* (complexe *M. avium*) isolées à partir d'une culture. Ce test utilise la technique d'hybridation des acides nucléiques.

INTRODUCTION

Parmi les infections mycobactériennes survenant chez les patients atteints du SIDA ou chez les immunodéprimés, les plus fréquentes sont liées aux mycobactéries du complexe *M. avium* (7, 15). L'incidence pathogénique du complexe *M. avium* dans les maladies pulmonaires chroniques est également de plus en plus importante (8,17). Récemment, plusieurs laboratoires ont rapporté qu'ils identifiaient au moins autant de souches appartenant au complexe *M. avium* que de souches de *M. tuberculosis* (17). Le traitement de ces infections est difficile et leur sévérité requiert un diagnostic rapide.

Le complexe *M. avium* se compose de mycobactéries à croissance lente qui produisent peu ou pas de pigments, n'hydrolysent ni le TWEEN 80 ni l'urée, ne réduisent pas les nitrates, produisent moins de 45 mm de mousse lors du test semi-quantitatif de la catalase, et donnent des réactions positives pour la nicotinamidase et la pyrazinamidase. On admet généralement que le complexe *M. avium* comprend deux espèces: *M. avium* et *M. intracellulare* (19). Les phénotypes de ces deux microorganismes sont pratiquement identiques et les tests biochimiques ne permettent pas de les différencier.

Les méthodes couramment utilisées pour identifier les mycobactéries du complexe *M. avium* comprennent la mise en culture, l'analyse biochimique, le sérotypage, la GLC (gas liquid chromatography), l'HPLC (high performance liquid chromatography), et l'utilisation de sondes d'ADN marquées par des isotopes, qui réagissent avec l'ARN ribosomal (Système de Diagnostic Rapide GEN-PROBE pour le complexe *M. avium*) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Un sérotypage réalisé avec des sérums adsorbés contenant des anticorps spécifiques d'antigènes cellulaires de surface peut permettre d'identifier *M. avium* ou *M. intracellulare*. Cependant, de récentes études sur la T-catalase, le polymorphisme des fragments de restriction et l'hybridation ADN-ADN, ont démontré que certains sérovars attribués initialement à *M. intracellulare* appartenaient en réalité à l'espèce *M. avium* (1, 14, 21).

Il existe donc un petit nombre de souches identifiées au plan biochimique comme appartenant au complexe *M. avium*, qui ne peuvent être classés avec certitude par les méthodes précédemment citées comme *M. avium* ou *M. intracellulare*. Le statut taxinomique exact de ce genre de souches est actuellement mal défini. Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE permet de mettre en évidence *M. avium*, *M.*

Français

intracellulaire, et d'autres souches récemment identifiées comme appartenant au complexe *M. avium*. Il ne permet pas de différencier les espèces du complexe entre elles (20, 22, 23). Quelques rares souches du complexe *M. avium* peuvent ne pas donner de réaction positive avec ce test.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables (4). La méthode ACCUPROBE utilise une sonde ADN monocaténaire conjuguée à un marqueur chimiluminescent complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) de l'organisme-cible. Lorsque l'ARNr de l'organisme-cible est libéré, la sonde s'hybride avec celui-ci pour former un complexe ADN-ARN stable. Le Réactif de Sélection permet de différencier les sondes hybridées des sondes non-hybridées. Le luminomètre GEN-PROBE permet de mesurer le signal lumineux émis par les hybrides ADN-ARN. Le résultat est positif si le luminomètre indique une valeur supérieure ou égale à la valeur seuil; il est négatif s'il indique une valeur inférieure.

RÉACTIFS

Les réactifs utilisés pour le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET SONDE POUR LE COMPLEXE *M. AVIUM* ACCUPROBE

Réactif Sonde (P) (4 x 5 tubes)

Complexe *M. avium*

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

Billes de verre et tampon

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES ACCUPROBE

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

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

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

Solution tamponnée

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

Solution tamponnée

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION GEN-PROBE

Réactif de Détection I (RI) 1 x 240 ml

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

Réactif de Détection II (RII) 1 x 240 ml

Hydroxide de sodium 1 N

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (2).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification des mycobactéries du complexe *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'élimination de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azide dans la plomberie.
- G. Eviter le contact des Réactifs de Détection I et II avec la peau 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 leur sachet en aluminium à 2° - 8°C. Avant ouverture, ils sont stables jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le sachet doit être refermé hermétiquement et les tubes doivent être utilisés dans un délai de deux mois, dans la limite de la date de péremption.

Les autres réactifs du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE est conçu pour déterminer l'identité du complexe *M. avium* isolé à partir d'une culture.

- A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des colonies isolées sur un milieu solide approprié, comme une gélose inclinée de Löwenstein-Jensen, ou des milieux de Middlebrook 7H10 ou 7H11, lorsqu'on observe une morphologie évocatrice du complexe *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 laquelle 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 de la suspension du bouillon parfaitement mélangé, et le distribuer dans le Tube de Lyse en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

MATÉRIEL FOURNI

TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE

bioMérieux réf. 39001 / GEN-PROBE Cat. No. 102845/2845

	<u>20 tests</u>
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 Néphélomètre 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.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR GEN-PROBE:

Luminomètre GEN-PROBE LEADER 50i

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

Sonicateur GEN-PROBE

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

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)

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)

Portoir de tubes pour le sonicateur GEN-PROBE

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

MODE OPÉRAIRE

A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

1. Remplir le réservoir du sonicateur d'eau chaude jusqu'à environ 1 cm du bord.
2. L'eau du bain à ultrasons doit être parfaitement dégazée avant la manipulation afin d'optimiser le transfert d'énergie des ultrasons. Pour dégazer l'eau entièrement, faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Régler un bloc chauffant ou un bain-marie à 60° ± 1 °C et un autre bloc chauffant ou bain-marie à 95° ± 5 °C.
4. Préparer le luminomètre GEN-PROBE pour la lecture. 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) ou de *M. intracellulare* (par ex. ATCC 13950) comme contrôle positif, ainsi qu'une culture de *M. tuberculosis* (par ex. ATCC 25177) 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 bouillons 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 les dilutions du Réactif 1 et du Réactif 2 pour remettre les cellules en suspension.
4. Reboucher les Tubes de Lyse et les agiter brièvement à l'aide d'un Vortex.

D. LYSE 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-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 $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ au bain-marie ou dans 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 à l'aide du luminomètre dans l'heure qui suit.**

G. DÉTECTION

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

REMARQUES

- A. **RÉACTIFS:** le Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) peut précipiter. Le chauffer à 35° - 60°C et l'agiter pour dissoudre le précipité.
- B. **TEMPÉRATURE:** l'hybridation et la sélection sont des réactions thermo-dépendantes. Par conséquent il est impératif 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 Virtex:** 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. tuberculosis*, ATCC 25177), supérieures à 10.000 RLU (Relative Light Units) sur le LEADER ou à 300 PLU (Photometric Light Units) sur l'ACCULDR (anciennement PAL) peuvent être observées soit lorsque l'homogénéisation a été insuffisante après l'addition du Réactif 3 (Réactif de Sélection), soit lorsque différents types de colonies sont présents. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.
 2. Des valeurs faibles de contrôle positif (*M. avium*, ATCC 25291 ou *M. intracellulare*, ATCC 13950), inférieures à 30.000 RLU sur le LEADER ou à 900 PLU sur 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 DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil. Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

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. tuberculosis*, ATCC 25177) et positifs (par ex. *M. avium*, ATCC 25291), qu'ils proviennent d'un bouillon de culture ou d'une culture en milieu solide, doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

ACCULDR (anciennement PAL)	LEADER
--------------------------------------	---------------

Contrôle négatif	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Contrôle positif	> 900 PLU	> 30.000 RLU

Si les contrôles se trouvent en-dehors de ces zones, les résultats du test ne doivent pas être pris en considération.

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.

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLED'UNE CULTURE ne permet pas de différencier les espèces du complexe *M. avium* entre elles. Les souches de l'une ou l'autre de ces espèces seront donc identifiées en tant que complexe *M. avium*.

Il existe un petit nombre de souches identifiées au plan biochimique comme appartenant au complexe *M. avium*, qui ne peuvent être différenciés en tant que *M. avium* ou *M. intracellulare*, que ce soit par sérologie ou par HPLC. Certaines de ces souches peuvent également ne pas être décelées par le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE. Le statut taxinomique exact de ce genre de souches est encore mal défini. Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE identifie les souches du complexe *M. avium* identifiées comme telles par HPLC ou GLC. Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE peut identifier des souches atypiques provenant du complexe *M. avium*, dont la signification clinique n'est pas encore bien établie.

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE doivent être interprétés en fonction des autres données du laboratoire et corrélés avec les données cliniques.

VALEURS ATTENDUES

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE a été comparé aux méthodes classiques de culture avec identification biochimique sur trois sites. Le Site 1 dépendait de Gen-Probe; les Sites 2 et 3 étaient des laboratoires de référence. 717 souches du complexe *M. avium* (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare*, et 624 complexe *M. avium*) et 235 souches de mycobactéries de 22 espèces différentes ont été testées. Les souches ont été déterminées positives (> 30.000 RLU) ou négatives (< 30.000 RLU). Les cultures négatives ont donné des résultats compris entre 1.353 et 14.675 RLU, les cultures positives des résultats se situant entre 30.829 et 2.742.691 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure ci-dessous.

ACCUPROBE / PROCÉDÉS BIOCHIMIQUES CLASSIQUES

ACCUPROBE Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Site 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Site 3	526	0	17	74	96,9%/100%	97,2%
Total	716	0	18	223	97,6%/100%	98,1%

Après résolution des discordances:

ACCUPROBE / PROCÉDÉS BIOCHIMIQUES CLASSIQUES

ACCUPROBE Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Site 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Site 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Total	716	0	2	235	99,9%/100%	99,9%

Le seul échantillon discordant pour le site (2416) a été analysé par le CDC d'Atlanta en Géorgie et a été identifié en tant que complexe *M. avium* par HPLC. L'antibiogramme de ce microorganisme et les résultats biochimiques étaient atypiques.

Le Site 3 avait initialement 17 résultats discordants. Deux d'entre eux (7755 et 5113) n'avaient pas été correctement identifiés, et ont été réidentifiés par HPLC et GLC comme *M. nonchromogenicum*. Trois cultures, dont deux mixtes (4750 et 8168), et une non-viable (0601) ont été retirées de l'étude. Deux autres souches ont été retirées de l'étude car elles ne pouvaient être identifiées de façon certaine comme appartenant au complexe *M. avium*: 2344 et 5124 ont été identifiés comme "très proches du complexe *M. avium*". 7 parmi les 10 discordants restants ont été retestés par HPLC au CDC. Les souches PE09 et 6458 ont été identifiées comme *M. xenopi* 2, les souches 9714 et 8310 comme complexe *M. terrae*. Les souches 1264 et 3634 ont été identifiées comme *M. scrofulaceum* par le CDC d'après ses propres profils HPLC. La souche 1264 correspondait au profil SC007, et la souche 3634 au profil EM002.

La souche 0214 a été identifiée comme *M. simiae*, tandis que la souche 8153 a été confirmée par HPLC comme correspondant au profil MAIS (*M. avium* intracellulare scrofulaceum) EM005. Les souches 2888 et 2971 ont été identifiées comme "scotochromogènes non identifiées". Les espèces du complexe *M. avium* ne sont pas scotochromogènes.

Ainsi, après résolution, la sensibilité globale est de 99,9%, la spécificité de 100%, et le taux de concordance de 99,9%.

Parmi 148 souches atypiques du complexe *M. avium*, testés une nouvelle fois par les laboratoires de référence parce que difficiles à identifier, 120 ont réagi positivement au test et 28 négativement. Ces souches sont actuellement à l'étude au CDC. Le statut taxinomique des souches atypiques du complexe *M. avium* est également en cours de révision par l'International Working Group in Mycobacterial Taxonomy.

PERFORMANCE DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

La précision intra-essai du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE *M. AVIUM* ISOLEES D'UNE CULTURE a été calculée en testant deux concentrations différentes d'ARN ribosomal provenant soit de *M. avium*, soit de *M. intracellulare*, soit des espèces non *M. avium* ou non *M. intracellulare* du complexe *M. avium*. Le même échantillon a été testé 12 fois dans une même série.

	<u>M. avium</u>	
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	67.574	112.246
Ecart-type	2.900	3.429
Coefficient de variation	4,3%	3,1%

	<u>M. intracellulare</u>	
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	61.758	100.736
Ecart-type	3.941	3.275
Coefficient de variation	6,4%	3,3%

	<u>M. avium complex</u>	
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	64.148	113.049
Ecart-type	3.384	3.249
Coefficient de variation	5,3%	2,9%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

La précision inter-essai a été calculée en analysant en simple deux concentrations différentes d'ARN ribosomal provenant soit de *M. avium*, soit de *M. intracellulare*, soit des espèces non *M. avium* ou non *M. intracellulare* du complexe *M. avium* au cours de 10 séries distinctes.

	<u>M. avium</u>	
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	65.790	125.506
Ecart-type	4.535	9.115
Coefficient de variation	6,9%	7,3%

	<u>M. intracellulare</u>	
Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne(RLU)	60.175	104.203
Ecart-type	6.339	9.239
Coefficient de variation	10,5%	8,9%

M. avium complex

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	64.187	111.197
Ecart-type	4.659	10.011
Coefficient de variation	7,3%	9,0%

C. SPÉCIFICITÉ

Au total 122 souches ATCC ont été étudiées à l'aide du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE. Ces souches représentaient au total 93 espèces issues de 37 genres microbiens différents. Un panel phylogénétique de 3 souches du complexe *M. avium*, 60 souches de 55 autres espèces de mycobactéries et 59 souches issues de 36 autres genres a été testé. Seules les souches du complexe *M. avium* ont donné un résultat positif avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DES MYCOBACTERIES DU COMPLEXE M. AVIUM ISOLEES D'UNE CULTURE.

D. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions d'ARN ribosomal provenant soit de *M. avium*, soit de *M. intracellulare*, soit des espèces non *M. avium* ou non *M. intracellulare* du complexe *M. avium*, dont les concentrations étaient comprises entre $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg et $4,0 \cdot 10^{-2}$ mg par test ont été analysées en présence de 15 millions de microorganismes appartenant à l'une des espèces suivantes: *M. terrae*, *M. simiae*, ou *Nocardia asteroides*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.



AccuProbe

TEST DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)

UTILIZACIÓN

EL TEST ACCUPROBE PARA IDENTIFICAR A PARTIR DE CULTIVO EL COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM es un test de identificación rápida mediante sonda DNA de las micobacterias del complejo *Mycobacterium avium* (complejo *M. avium*) aisladas a partir de un cultivo. Este test utiliza la técnica de hibridación de los ácidos nucleicos.

INTRODUCCIÓN

Entre las infecciones micobacterianas que ocurren en los pacientes del SIDA o en los inmunodeprimidos, las más frecuentes están relacionadas con las micobacterias del complejo *M. avium* (7, 15). La incidencia patogénica del complejo *M. avium* en las enfermedades pulmonares crónicas es también cada vez mayor (8, 17). Recientemente, varios laboratorios han indicado que identificaban al menos tantas cepas del complejo *M. avium* como cepas de *M. tuberculosis* (17). El tratamiento de estas infecciones es difícil y su severidad requiere un diagnóstico rápido.

El complejo *M. avium* consta de micobacterias de crecimiento lento que producen pocos o ningún pigmento, no hidrolizan ni el TWEEN 80 ni la urea, no reducen los nitratos, producen menos de 45 mm de espuma durante el test semicuantitativo de la catalasa, y dan reacciones positivas para la nicotinamidasasa y la pirazinamidasasa. Se admite generalmente que el complejo *M. avium* incluye dos especies: *M. avium* y *M. intracellulare* (19). Los fenotipos de estos microorganismos son prácticamente idénticos y los test bioquímicos no permiten diferenciarlos.

Los métodos habitualmente utilizados para identificar las micobacterias del complejo *M. avium* incluyen la puesta en cultivo, el análisis bioquímico, la tipificación serológica, la GLC (gas liquid chromatography), la HPLC (high performance liquid chromatography) y la utilización de sondas de DNA marcadas por isótopos, que reaccionan con el RNA ribosómico (Sistema de diagnóstico rápido GEN-PROBE para el complejo *M. avium*) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Una tipificación serológica realizada con sueros absorbidos que contienen anticuerpos específicos de antígenos celulares de superficie puede permitir identificar *M. avium* o *M. intracellulare*. Sin embargo, recientes estudios sobre la T-catalasa, el polimorfismo de los fragmentos de restricción y la hibridación DNA-DNA, han demostrado que ciertas serovariedades atribuidas inicialmente a *M. intracellulare* pertenecían en realidad a la especie *M. avium* (1, 14, 21).

Existe entonces una pequeña cantidad de cepas identificadas bioquímicamente como pertenecientes al complejo *M. avium*, que no pueden clasificarse con certeza utilizando los métodos anteriormente citados como *M. avium* o *M. intracellulare*. La taxonomía exacta de este tipo de cepas está actualmente mal definida. El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO permite poner en evidencia *M. avium*, *M. intracellulare*, y otras cepas recientemente identificadas

como pertenecientes al complejo *M. avium*. No permite diferenciar las especies del complejo entre sí (20, 22, 23). Algunas cepas raras del complejo *M. avium* pueden no dar reacción positiva con este test.

PRINCIPIO

Los tests por hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para unirse de modo específico, formando complejos bicatenarios estables (4). El método ACCUPROBE utiliza una sonda de DNA monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del RNA ribosómico (RNAr) del organismo diana. Cuando el RNAr del organismo diana es liberado, la sonda se hibrida con éste para formar un complejo DNA-RNA estable. El Reactivo de Selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las sondas no hibridadas. El luminómetro GEN-PROBE permite medir la señal luminosa emitida por los híbridos DNA-RNA. 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 IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO se suministran en tres kits distintos:

KIT SONDA PARA EL COMPLEJO M. AVIUM ACCUPROBE

Reactivo Sonda (P) (4 x 5 tubos)

Complejo *M. avium*

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

Bolas de vidrio y tampón

KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS ACCUPROBE

Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) (1) 1 x 10 ml

Solución tampón que contiene 0,04% de azida sódica

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

Solución tampón

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

Solución tampón

KIT DE REACTIVOS DE DETECCIÓN GEN-PROBE

Reactivo de Detección I (RI) 1 x 240 ml

0,1% de agua oxigenada en ácido nítrico 0,001 N

Reactivo de Detección II (RII) 1 x 240 ml

Hidróxido de sodio 1 N

PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Observar las precauciones habituales durante la realización de este test (2).
- C. Utilizar exclusivamente para la identificación de micobacterias del complejo *M. avium* aislado a partir de un cultivo.
- D. Utilizar sólo material suministrado o material desechable.
- E. La manipulación de los cultivos y todas las etapas del procedimiento hasta la etapa de inactivación térmica deben efectuarse en un recinto con seguridad microbiológica de clase II.

- F. Los reactivos de este kit contienen azida sódica, susceptible de reaccionar con el plomo o el cobre de las tuberías, formando azidas metálicas explosivas. Al desechar estos reactivos, enjuagar con agua abundante para evitar la formación de azidas en las tuberías.
- G. Evitar el contacto de los Reactivos de Detección I y II con la piel y las mucosas. En caso de contacto, enjuagar con agua. Si estos reactivos se derraman, diluirlos con agua antes de secarlos.

CONSERVACIÓN

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

Los otros reactivos del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO pueden conservarse entre 2° y 25°C, y permanecen estables hasta la fecha de caducidad.

NO CONGELAR LOS REACTIVOS.

TOMA Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO ha sido diseñado para identificar el complejo *M. avium* aislado a partir de un cultivo.

- A. **Identificación a partir de cultivo en medio sólido.** El test puede ser realizado con colonias aisladas en un medio sólido apropiado, como Löwenstein-Jensen, o medios de Middlebrook 7H10 ó 7H11, cuando se observe una morfología que evoque el complejo M. Avium. La muestra puede analizarse desde el momento en que la proliferación es visible y durante los sesenta días de incubación siguientes.
 1. La muestra de cultivo puede obtenerse con ayuda de un asa de plástico desechable de 1 µl, de un asa metálica o de una aguja de plástico desechable. No utilizar escobillones dada la escasa cantidad de líquido en el cual se pondrán las micobacterias en suspensión.
 2. Evitar que la muestra incluya medio de cultivo junto con las micobacterias.
 3. El usuario puede decidir en esta etapa sembrar en otro medio de cultivo para confirmar la pureza de la muestra aislada.
- B. **Identificación a partir de caldo de cultivo.** El test puede realizarse a partir de cultivo de caldo Middlebrook 7H9 que posea una opacidad superior o igual a 1 McFarland. Tomar con pipeta una muestra de 100 µl de la suspensión de caldo perfectamente homogeneizada y distribuida en el tubo de lisis siguiendo las instrucciones del párrafo PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

MATERIAL SUMINISTRADO

TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO

bioMérieux ref. 39001 / GEN-PROBE Cat. No. 102845/2845

	<u>20 tests</u>
Reactivo Sonda (P)	4 x 5 tubos
Tubo de Lisis (LT)	1 x 20 tubos

MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Asas de 1 µl de plástico estéril, asas metálicas o agujas de plástico para tomar muestras de colonias
Cepas de control de los cultivos

Baño maría o bloque calefactor ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)*

Baño maría o bloque calefactor ($95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$)*

Micropipetas (100 μl , 300 μl)

Pipetas de repetición (100 μl , 300 μl)

Vortex

McFarland 1 Nephelometer Standard

* Los emplazamientos dentro del bloque calefactor deben adaptarse a tubos de 12 X 75 mm. Se recomienda el empleo 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)

Sonicador GEN-PROBE

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

KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS ACCUPROBE

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

KIT DE REACTIVOS DE DETECCIÓN GEN-PROBE

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

Bloque calefactor ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

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

Bloque calefactor ($95^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

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

Bloque calefactor ($60^{\circ}/95^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

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

Portatubos para el sonicador GEN-PROBE

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

TÉCNICA

A. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

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

B. CONTROLES

Las cepas de control positivo y negativo deben analizarse rutinariamente en cada laboratorio. Conforme a la reglamentación vigente. Se puede utilizar un cultivo de *M. avium* (por ejemplo: American Type Culture Collection, ATCC 25291) o de *M. intracellulare* (por ejemplo: ATCC 13950) como control positivo, así como un cultivo de *M. tuberculosis* (por ejemplo: ATCC 25177) como control negativo.

C. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Identificar un número suficiente de tubos de lisis para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
2. Transferir con una pipeta 100 µl de Reactivo 1 y 100 µl de Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) en todos los tubos de lisis. **Si el test se realiza en cepas aisladas a partir de caldo de cultivo, no añadir Reactivo 1 en los tubos de lisis.**
3. Transferir la muestra procedente de medio sólido o 100 µl del caldo de cultivo correctamente homogeneizado en los Tubos de Lisis, siguiendo las instrucciones dadas en el párrafo TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. Si el test se realiza sobre un cultivo en medio sólido, agitar con un asa en el Reactivo 1 y Reactivo 2 para poner las células en suspensión.
4. Volver a tapar los tubos de lisis y agitarlos brevemente con ayuda de un Vortex.

D. LISIS DE LA MUESTRA

1. Insertar los tubos de lisis en el portatubos del sonicador, de manera que la muestra reactiva en el fondo de los tubos quede sumergida, manteniendo los tapones fuera del agua. Poner el portatubos en su lugar. **LOS TUBOS NO DEBEN EN NINGÚN CASO 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 tras la lisis por sonicación, en el bloque calefactor o en el baño maría a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
4. Retirar cuidadosamente los tubos de lisis del bloque calefactor o de baño maría.

E. HIBRIDACIÓN

1. Cortar horizontalmente la parte superior de las bolsas de aluminio. Retirar el número necesario de tubos de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Volver a cerrar la bolsa herméticamente doblando varias veces su extremo y fijándola con cinta adhesiva o con una pinza. **No retirar la bolsa deshidratante.**
2. Identificar un número suficiente de Reactivo Sonda para analizar las muestras y/o las cepas de control. Retirar y conservar los tapones.
3. Después de la lisis, tomar 100 µl de muestra 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 baño maría o en el bloque calefactor.

F. SELECCIÓN

1. Retirar los tubos de Reactivo Sonda del baño maría o del bloque calefactor. Retirar y conservar los tapones. Distribuir 300 µl 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 al menos 5 minutos. Retirar y desechar los tapones. **Leer los resultados utilizando un luminómetro en la hora siguiente.**

G. DETECCIÓN

1. Seleccionar el protocolo adecuado en el luminómetro.
2. Con el fin de retirar cualquier residuo de la superficie de los tubos, limpiarlos con papel absorbente húmedo. Colocar a continuación los tubos en el luminómetro y seguir las instrucciones.
3. Una vez terminado el análisis, retirar los tubos del luminómetro.

OBSERVACIONES

- A. **REACTIVOS:** el Reactivo 2 (Tampón de Hibridación) puede precipitar. Calentar a 35° - 60°C y agitarlo para disolver el precipitado.
- B. **TEMPERATURA:** la hibridación y la selección son reacciones termodependientes. En consecuencia, es obligatorio mantener el baño maría o el bloque calefactor a la temperatura adecuada.
- C. **DURACIÓN DE LAS OPERACIONES:** las reacciones de hibridación y de selección son dependientes del tiempo. La hibridación debe durar al menos 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCIÓN, incubar los tubos de Reactivo Sonda durante por lo menos 5 minutos, pero no más de 6 minutos.
- D. **BAÑO MARÍA:** el nivel de agua debe ser suficientemente alto para que los tubos de lisis queden sumergidos hasta el anillo de cierre, pero no por encima. Verificar también que la totalidad del líquido reactivo de los tubos de Reactivo Sonda se encuentre sumergida.
- E. **UTILIZACIÓN DEL Vortex:** es esencial disponer de una mezcla homogénea durante las etapas de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA y de SELECCIÓN, en particular después de añadir los microorganismos a los Reactivos 1 y 2, y después de la adición del Reactivo 3.
- F. **RESOLUCIÓN DE LOS INCIDENTES**
 1. Valores elevados de control negativo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units) en el LEADER o a 300 PLU (Photometric Light Units) en el ACCULEADER (antiguo PAL) pueden observarse cuando la homogeneización ha sido insuficiente después de añadir el Reactivo 3 (Reactivo de Selección), o bien cuando diferentes tipos de colonias se encuentran presentes. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede sembrar una parte en un medio sólido apropiado e incubarlo.
 2. Valores débiles de control positivo (*M. avium*, ATCC 25291 o *M. intracellulare*, ATCC 13950), inferiores a 30.000 RLU en el LEADER o a 900 PLU en el ACCULEADER (antiguo PAL) pueden observarse cuando el número de gérmenes es insuficiente, cuando la sonicación no ha sido realizada correctamente o cuando el test se aplica en cultivos mixtos o envejecidos. Para verificar si se trata de un cultivo mixto, se puede sembrar una parte en un medio sólido apropiado e incubarlo.

RESULTADOS

A. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO son interpretados en función de un valor umbral. Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual a este umbral, son consideradas positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se sitúa en una zona de incertidumbre, la prueba debe repetirse. Si un segundo análisis sigue dando resultados dudosos, debe sembrarse nuevamente la cepa con el fin de verificar su pureza.

	ACCULDR (antiguo PAL)	LEADER
--	---------------------------------	---------------

Valor límite	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 (por ejemplo: *M. tuberculosis*, ATCC 25177) y positivos (por ejemplo: *M. avium*, ATCC 25291), procedentes de un caldo de cultivo o de un cultivo en medio sólido, deben satisfacer los siguientes valores:

	ACCULDR (antiguo PAL)	LEADER
--	---------------------------------	---------------

Control negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Control positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

Si los controles se encuentran fuera de estas zonas, no se deben tomar en consideración los resultados del test.

LÍMITES DEL TEST

Este método ha sido analizado en cultivos frescos realizados en medios sólidos y en los tipos de caldos de cultivo mencionados en el párrafo OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. No han sido evaluados los rendimientos de este test practicado directamente sobre muestras clínicas (urinarias, coprológicas o respiratorias).

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO no permite diferenciar las especies del complejo *M. avium* entre sí. Las cepas de una u otra de estas especies se identificarán como complejo *M. Avium*.

Existe un pequeño número de cepas identificadas bioquímicamente como pertenecientes al complejo *M. avium* o *M. Intracellulare*, ya sea por serología o por HPLC. Algunas de estas cepas también pueden no ser detectadas por el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO. La taxonomía exacta de este tipo de cepas está actualmente mal definida. El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO identifica las cepas del complejo *M. avium* identificadas como tales por HPLC o GLC. El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO puede identificar cepas atípicas provenientes del complejo *M. avium*, cuyo significado clínico no se ha todavía establecido.

Los resultados del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO deben ser interpretados en función de los otros datos del laboratorio y confrontados con los datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AVIUM AISLADO DE UN CULTIVO ha sido comparado con los métodos clásicos de cultivo con identificación bioquímica en tres sitios. El Sitio 1 dependía de Gen-Probe; los Sitios 2 y 3 eran laboratorios de referencia. 717 cepas del complejo *M. avium* (51 *M. avium*, 42 *M. Intracellulare* y 624 complejo *M. avium*) y 235 cepas de micobacterias de 22 especies diferentes han sido analizadas. Las cepas han sido determinadas positivas (> 30.000 RLU) o negativas (< 30.000 RLU). Los cultivos negativos han dado resultados comprendidos entre 1.353 y 14.675 RLU, los cultivos positivos de los resultados se sitúan entre 30.829 y 2.742.691 RLU. La comparación de estos resultados con los métodos clásicos de identificación figuran a continuación.

ACCUPROBE / PROCÉDIMENTOS BIOQUÍMICOS CLÁSICOS

ACCUPROBE Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/Especificidad	% Concordancia
Sitio 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Sitio 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Sitio 3	526	0	17	74	96,9%/100%	97,2%
Total	716	0	18	223	97,6%/100%	98,1%

Después de resolución de las discordancias

ACCUPROBE / PROCÉDIMENTOS BIOQUÍMICOS CLÁSICOS

ACCUPROBE Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/Especificidad	% Concordancia
Sitio 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Sitio 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Sitio 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Total	716	0	2	235	99,9%/100%	99,9%

La única muestra discordante para el sitio (2416) ha sido analizada por el CDC de Atlanta en Georgia (EE.UU.) y ha sido identificado como complejo *M. avium* por HPLC. El antibiograma de este microorganismo y los resultados bioquímicos eran atípicos.

El Sitio 3 tenía inicialmente 17 resultados discordantes. Dos de ellos (7755 y 5113) no habían sido identificados correctamente y lo fueron por HPLC y GLC como *M. nonchromogenicum*. Tres cultivos, de los cuales dos mixtos (4750 y 8168), y uno no viable (0601) fueron retirados del estudio. Dos otras cepas también fueron retiradas del estudio porque no podían ser identificadas con certeza como pertenecientes al complejo *M. avium*: 2344 y 5124 fueron identificados como "muy cercanos del complejo *M. avium*". 7 de los 10 discordantes restantes fueron analizados nuevamente por HPLC en el CDC. Las cepas PE09 y 6458 fueron identificadas como *M. xenopi* 2, las cepas 9714 y 8310 como complejo *M. terrae*. Las cepas 1264 y 3634 fueron identificadas como *M. scrofulaceum* por el CDC de acuerdo con sus propios perfiles HPLC. La cepa 1264 correspondía al perfil SC007, y la cepa 3634 al perfil EM002.

La cepa 0214 ha sido identificada como *M. simiae*, mientras que la cepa 8153 ha sido confirmada por HPLC como correspondiente al perfil MAIS (*M. avium* intracellulare *scrofulaceum*) EM005. Las cepas 2888 y 2971 han sido identificadas como "escotocromógenas no identificadas". Las especies del complejo *M. avium* no son escotocromógenas.

Así, después de la resolución, la sensibilidad global es del 99,9%, la especificidad del 100%, y la tasa de concordancia del 99%.

De las 148 cepas atípicas del complejo *M. avium*, analizadas una vez más por los laboratorios de referencia porque eran difíciles de identificar, 120 reaccionaron positivamente al test y 28 negativamente. Estas cepas están siendo estudiadas actualmente en el CDC. El estatuto taxonómico de las cepas atípicas del complejo *M. avium* también está siendo revisado por el International Working Group in Mycobacterial Taxonomy.

RENDIMIENTOS DEL TEST

A. PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

La precisión intra-ensayo del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AXIUM AISLADO DE UN CULTIVO ha sido calculada analizando dos concentraciones diferentes de RNA ribosómico provenientes ya sea de *M. avium*, o bien de *M. intracellulare*, ya sea de especies no *M. avium* o no *M. intracellulare* del complejo *M. avium*. La misma muestra ha sido analizada 12 veces en una misma serie.

	<u>M. avium</u>	
Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	67.574	112.246
Desviación típica	2.900	3.429
Coefficiente de variación	4,3%	3,1%

	<u>M. intracellulare</u>	
Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	61.758	100.736
Desviación típica	3.941	3.275
Coefficiente de variación	6,4%	3,3%

	<u>Complejo M. avium</u>	
Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	64.148	113.049
Desviación típica	3.384	3.249
Coefficiente de variación	5,3%	2,9%

B. PRECISIÓN INTER-ENSAYO

La precisión inter-ensayo ha sido calculada analizando en simple dos concentraciones de RNA ribosómico provenientes de *M. avium*, o bien de *M. intracellulare*, ya sea de especies no *M. avium* o no *M. intracellulare* del complejo *M. avium* durante 10 series distintas.

	<u>M. avium</u>	
Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	65.790	125.506
Desviación típica	4.535	9.115
Coefficiente de variación	6,9%	7,3%

	<u>M. intracellulare</u>	
Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	60.175	104.203
Desviación típica	6.339	9.239
Coefficiente de variación	10,5%	8,9%

Complejo *M. avium*

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	64.187	111.197
Desviación típica	4.659	10.011
Coefficiente de variación	7,3%	9,0%

C. ESPECIFICIDAD

Un total de 122 cepas ATCC fueron estudiadas mediante el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AXIUM AISLADO DE UN CULTIVO. Estas cepas representaban un total de 93 especies provenientes de 37 géneros microbianos diferentes. Se estudió un conjunto filogenético de 3 cepas del complejo *M. avium*, 60 cepas de 55 otras especies de micobacterias y 59 cepas provenientes de 36 otros géneros. Sólo las cepas del complejo *M. avium* dieron un resultado positivo con el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO M. AXIUM AISILADO DE UN CULTIVO.

D. TEST DE SOBRECARGA

Se analizaron diluciones de RNA ribosómico provenientes ya sea de *M. avium*, o bien de *M. intracellulare*, ya sea de especies no *M. avium* o no *M. intracellulare* del complejo *M. avium*, cuyas concentraciones estaban comprendidas entre $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg y $4,0 \cdot 10^{-2}$ mg mediante el test en presencia de 15 millones de microorganismos pertenecientes a una de las siguientes especies: *M. terrae*, *M. simiae*, o *Nocardia asteroides*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada.



AccuProbe

TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA COLTURA

(bioMérieux cod. 39001 / Gen-Probe Cat. N. 102845/2845)

IMPIEGO

IL TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI DA COLTURA è un test che impiega una sonda a DNA per la rapida identificazione dei micobatteri del gruppo *Mycobacterium avium* (*M. avium* complex) isolati a partire da una coltura. Questo test si avvale della tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Se si mettono a confronto le infezioni micobatteriche che insorgono in pazienti malati di AIDS o in soggetti immunodepressi, quelle più frequenti sono legate ai micobatteri del gruppo *M. avium* complex (7, 15). L'incidenza patogena del gruppo *M. avium* complex nelle affezioni polmonari croniche è sempre più rilevante (8, 17). In epoca recente, presso numerosi laboratori sono stati isolati e identificati diversi ceppi appartenenti al gruppo *M. avium* complex, in misura uguale o addirittura superiore al numero di ceppi isolati ed identificati appartenenti al gruppo *M. tuberculosis* complex (17). Trattare queste infezioni è un compito arduo e la loro gravità pone l'esigenza di una rapida diagnosi.

Il gruppo *M. avium* complex è composto da micobatteri a crescita lenta che non producono pigmenti (o ne producono una quantità irrilevante), non idrolizzano né il TWEEN 80 né l'urea e tanto meno riducono i nitrati; producono meno di 45 mm di schiuma durante il test semi-quantitativo della catalasi e presentano reazioni positive per la nicotinamidasi e la pirazinamidasi. In genere, si afferma che il gruppo del *M. avium* complex comprende due specie: *M. avium* e *M. intracellulare* (19). I fenotipi di questi due microrganismi sono praticamente identici e i test biochimici non consentono una loro differenziazione.

I metodi tradizionalmente impiegati per identificare i micobatteri del gruppo *M. avium* complex sono la coltura, l'analisi biochimica, la sierotipizzazione, la GLC (cromatografia gas-liquido), l'HPLC (cromatografia liquida ad alta risoluzione) e l'impiego di sonde genetiche marcate da isotopi che reagiscono con l'RNA ribosomiale (Sistema Diagnostico Rapido GEN-PROBE per il *M. avium* complex) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Una sierotipizzazione condotta con sieri adsorbiti contenenti anticorpi specifici di antigeni cellulari di superficie può consentire l'identificazione di *M. avium* o *M. intracellulare*. Nondimeno, studi recenti sulla T catalasi, il polimorfismo dei frammenti di restrizione e l'ibridazione DNA-DNA hanno dimostrato che certi ceppi attribuiti in una fase iniziale al *M. intracellulare* appartenevano in realtà al gruppo del *M. avium* complex (1, 14, 21).

A livello biochimico vi è quindi una piccola quantità di ceppi identificati come appartenenti al gruppo *M. avium* complex che non possono essere classificati con certezza ricorrendo alle metodiche succitate come *M. avium* o *M. intracellulare*. Lo stato tassonomico preciso di questo genere di ceppi non è stato ancora correttamente definito. Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M.

AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA consente di evidenziare *M. avium*, *M. intracellulare* e altri ceppi recentemente identificati come appartenenti al gruppo *M. avium* complex. Non consente di differenziare le specie del gruppo fra loro (20, 22, 23). Alcuni ceppi rari del *M. avium* complex possono non provocare una reazione positiva con questo test.

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 (4). Il metodo ACCUPROBE impiega una sonda a DNA a catena singola - associata ad un marker chemiluminescente - complementare al 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 od uguale al valore soglia, negativo se indica un valore inferiore.

REAGENTI

I reagenti impiegati per il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX vengono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER IL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ACCUPROBE

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

KIT REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DELLE COLTURE ACCUPROBE

<u>Reagente 1</u> (Reagente di Lisi) (1)	1 x 10 ml
Soluzione tamponata contenente 0,01% 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 REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

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

PRECAUZIONI D'USO

- A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.
- B. Adottare le normali precauzioni durante l'esecuzione di questo test (2).
- C. Il test è destinato all'identificazione dei micobatteri del gruppo M avium complex 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 e delle mucose con i Reagenti di Rivelazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli abbondantemente con acqua prima di asciugare la superficie.

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.

Tutti gli altri reagenti contenuti nel KIT ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA si conservano ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA è stato ideato per identificare i Micobatteri del gruppo *M. avium* complex isolato a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura su terreno solido.** Il test può essere condotto su colonie isolate su un terreno solido adeguato, come un terreno di coltura a becco di clarino come il Löwenstein Jensen o il terreno di coltura di Middlebrook 7H10 o 7H11, quando si osserva una morfologia sospetta per il gruppo *M. avium* complex. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione e durante i successivi sessanta giorni di incubazione.
1. Il campione da coltura può essere prelevato con un'ansa di plastica monouso da 1 µl, con un'ansa metallica o con un ago in plastica monouso. Non usare tamponi data la bassa quantità di liquido in cui i micobatteri verranno rimessi in sospensione.
 2. Non prelevare dal terreno di coltura con i micobatteri.
 3. L'operatore, a questo punto, può decidere di inoculare un altro terreno di coltura per confermare la purezza del campione isolato.
- B. **Identificazione a partire da brodo di coltura.** Il test può essere condotto su colture in brodo di Middlebrook 7H9 con una torbidità superiore o uguale ad 1 McFarland. Servendosi di una pipetta, prelevare 100 µl della sospensione dal brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarla nella Provetta di Lisi seguendo le istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA

bioMérieux cod. 39001 / GEN-PROBE Cat. N. 102845/2845

20 test

Reagente Sonda (P)
Provette di Lisi (LT)

4 x 5 provette
1 x 20 provette

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

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

Ceppi di controllo delle colture

Bagnomaria o incubatore ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)*

Bagnomaria o incubatore ($95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$)*

Micropipette (100 µl, 300 µl)

Micropipette a volume fisso Eppendorf (100 µl, 300 µl)

Vortex

McFarland 1 Nefelometro Standard

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

MATERIALE SUPPLEMENTARE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE GEN-PROBE:

Luminometro GEN-PROBE LEADER 50i

(bioMérieux cod. 39400 / GEN-PROBE Cat. N. 103100i/3100i)

Sonicatore GEN-PROBE

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

KIT REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE

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

KIT REAGENTI DI RIVELAZIONE GEN-PROBE

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

Incubatore ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

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

Incubatore ($95^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

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

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

(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. Riempire il serbatoio del sonicatore con acqua calda fino ad 1 cm circa dal bordo.
2. L'acqua del sonicatore deve essere accuratamente degassificata prima di ogni prova per ottimizzare il trasferimento energetico degli ultrasuoni. Per degassificare completamente l'acqua, far funzionare il sonicatore per 15 minuti.
3. Impostare un incubatore o un bagnomaria ad una temperatura di $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e un altro incubatore o un bagnomaria a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
4. Preparare il luminometro LEADER GEN-PROBE. Assicurarsi che vi sia una quantità sufficiente di Reagenti di Rivelazione I e II per condurre i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio è necessario testare routinariamente ceppi di controllo positivo e negativo, conformemente alla normativa in vigore. Si può impiegare una coltura di *M. avium* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 25291) o di *M. intracellulare* (ad es. ATCC 13950) come controllo positivo così come una coltura di *M. tuberculosis* (ad es. ATCC 25177) come controllo negativo

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Contrassegnare una quantità sufficiente di Provette di Lisi per testare i campioni e/o i ceppi di

- controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
2. Dispensare con una 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 condotto su ceppi isolati a partire da brodo coltura, non aggiungere Reagente 1 nelle Provette di Lisi.**
 3. Trasferire nei corrispondenti Tubi di Lisi 100microlitri di coltura liquida o il campione da terreno solido come descritto nel PARAGRAFO RACCOLTA DEL CAMPIONE E PREPARAZIONE. Se il test è effettuato a partire da terreno di coltura solido è necessario ruotare l'ansa o l'ago nel mix dei Reagenti 1 e 2 per riportare le cellule in sospensione.
 4. Richiudere le Provette di Lisi e agitarle brevemente con un Vortex.
- D. LISI DEL CAMPIONE
1. Inserire le Provette di Lisi nel portaprovette del sonicatore per far sì che la miscela di reazione sul fondo delle provette venga completamente sommersa, 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. Trasferire le provette che contengono i lisati nell'incubatore o nel bagnomaria a $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti.
 4. Rimuovere con cautela 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 lo stock-culture di controllo. Richiudere la confezione in modo ermetico ripiegando più volte l'estremità e fermandola con nastro adesivo o con una clip. **Non asportare dalla confezione i dessiccanti.**
 2. Predisporre un numero sufficiente di provette di Reagente Sonda per testare i campioni e/o i ceppi di controllo. Rimuovere e conservare i tappi.
 3. Prelevare 100 µl di lisato dalle Provette di Lisi e dispensarlo nelle rispettive provette di Reagente Sonda.
 4. Richiudere le provette di Reagente Sonda e metterle in incubazione per 15 minuti ad una temperatura di $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a bagnomaria o nell'incubatore.
- F. SELEZIONE
1. Estrarre 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 sul Vortex per ottenere una miscela omogenea.
 2. Incubare le provette di Reagente Sonda per 5 minuti a una temperatura di $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a bagnomaria o nell'incubatore.
 3. Estrarre le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e lasciarle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e gettare i tappi. **Leggere i risultati sul luminometro entro l'ora successiva.**
- G. IDENTIFICAZIONE
1. Selezionare il protocollo appropriato sul luminometro.

2. Per eliminare completamente i residui dalla superficie delle provette, asciugare utilizzando un foglio assorbente inumidito. Inserire le provette nel luminometro e seguire le istruzioni.
3. Una volta terminata la lettura, estrarre le provette dal luminometro.

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e agitarlo per sciogliere il precipitato.
- B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile che il bagnomaria o l'incubatore rimangano alla temperatura prestabilita.
- C. DURATA DELLE OPERAZIONI: le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare da un minimo di 15 minuti ad un massimo di 20 minuti. Durante la fase di SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per almeno 5 minuti senza però superare il limite dei 6 minuti.
- D. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che le provette di lisi vengano sommerse fino all'anello di chiusura ma non oltre. Assicurarsi inoltre che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente sommerso.
- E. USO DEL Vortex: è fondamentale disporre di una miscela omogenea durante le tappe di PREPARAZIONE del CAMPIONE e della SELEZIONE, in particolare dopo l'inoculo dei microrganismi ai reattivi R1 e R2 e dopo l'aggiunta del R3.
- F. INDIVIDUAZIONE E SOLUZIONE DEI PROBLEMI
 1. Valori significativi di controllo negativo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), 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'aggiunta del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando siamo in presenza di colture miste. Per verificare se si tratta di una coltura mista possiamo trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla in incubazione.
 2. Valori non significativi di controllo positivo (*M. avium*, ATCC 25291 o *M. intracellulare*, ATCC 13950), 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 eseguita correttamente o quando il test viene condotto su colture miste o invecchiate. Per verificare se si tratta di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.

RISULTATI

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA vengono interpretati in funzione di un valore soglia. I campioni che evidenziano un segnale luminoso il cui valore sia superiore o uguale a questa soglia vengono considerati positivi. I segnali luminosi inferiori a questa soglia vengono considerati negativi. Quando il risultato si posiziona nell'area di incertezza, il test deve essere ripetuto. Se la seconda analisi continua ad indicare risultati equivoci, è necessario trapiantare il ceppo per verificarne la purezza

	ACCULDR (precedentemente PAL)	LEADER
Valore soglia	900 PLU	30.000 RLU
Area di incertezza	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTROLLO DI QUALITÀ ED ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) e positivi (ad es. *M. avium*, ATCC 25291), provenienti da brodo di coltura o da una coltura su terreno solido, devono rispettare i seguenti valori:

	ACCULDR (precedentemente PAL)	LEADER
Controllo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controllo positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

Nel caso in cui i controlli si posizionino al di fuori di questi range, i risultati non dovranno essere convalidati.

LIMITI DEL TEST

Questa metodica è stata testata su colture fresche realizzate su terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test condotto direttamente su campioni clinici (prelievi urinari, coprologici o respiratori) non sono stati valutati.

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX non consente di differenziare le specie del gruppo *M. avium* complex fra loro. I vari ceppi di queste specie verranno quindi identificati come *M. avium* complex.

Un ristretto numero di ceppi identificati, a livello biochimico, come appartenenti al gruppo *M. avium* complex, non possono essere differenziati come *M. avium* o *M. intracellulare*, né mediante sierologia né tramite HPLC. Alcuni di questi ceppi possono risultare anche non identificati tramite il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA. Lo stato tassonomico esatto di questo genere di ceppi non è stato ancora perfettamente definito. Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA identifica i ceppi del gruppo *M. avium* complex come tali tramite HPLC e GLC. Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA è in grado di identificare ceppi atipici provenienti dal gruppo *M. avium* complex, il cui significato clinico non è ancora stato pienamente stabilito.

I risultati del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA devono essere interpretati in funzione degli altri dati di laboratorio e correlati ai dati clinici.

VALORI ATTESI

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA è stato confrontato con i metodi tradizionali di coltura con identificazione biochimica in tre centri. Il primo dipendeva da Gen-Probe; il secondo ed il terzo erano centri di riferimento. Sono stati analizzati 717 ceppi del *M. avium* complex (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare*, e 624 *M. avium* complex) e 235 ceppi di micobatteri di 22 specie diverse. I ceppi sono stati considerati positivi (≥ 30.000 RLU) o negativi (≤ 30.000 RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 1.353 e 14.675 RLU; le colture positive hanno mostrato risultati compresi tra 30.829 e 2.742.691 RLU. Il confronto di questi risultati con i metodi tradizionali di identificazione vengono di seguito indicati.

ACCUPROBE / PROCESSI BIOCHIMICI TRADIZIONALI

ACCUPROBE Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Centro 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Centro 3	526	0	17	74	96,9%/100%	97,2%
Totale	716	0	18	223	97,6%/100%	98,1%

Dopo risoluzione delle discordanze:

ACCUPROBE / PROCESSI BIOCHIMICI TRADIZIONALI

ACCUPROBE Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Centro 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Centro 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Totale	716	0	2	235	99,9%/100%	99,9%

L'unico campione discordante per il secondo centro (2416) è stato analizzato dal CDC di Atlanta in Georgia ed è stato identificato come *M. avium* complex tramite HPLC. L'antibiogramma di questo microrganismo e i risultati biochimici risultavano atipici.

Presso il terzo centro si sono verificati inizialmente 17 risultati discordanti. Due di questi (7755 e 5113) non erano stati correttamente identificati e sono stati nuovamente identificati tramite HPLC e GLC come *M. nonchromogenicum*. Tre colture, di cui due miste (4750 e 8168) e una non valida (0601) sono state tolte dallo studio. Altri due ceppi sono stati ritirati dallo studio in quanto non potevano essere identificati in modo certo come "molto vicini al *M. avium* complex". 7 dei rimanenti 10 discordanti sono stati nuovamente analizzati tramite HPLC e CDC. I ceppi PE09 e 6458 sono stati identificati come *M. xenopi* 2, i ceppi 9714 e 8310 come *M. terrae* complex. I ceppi 1264 e 3634 sono stati identificati come *M. scrofulaceum* dal CDC in base ai rispettivi profili HPLC. Il ceppo 1264 corrispondeva al profilo SC007 ed il ceppo 3634 al profilo EM002.

Il ceppo 0214 è stato identificato come *M. simiae*, mentre il ceppo 8153, confermato mediante HPLC, come corrispondente al profilo MAIS (*M. avium* intracellulare scrofulaceum) EM005. I ceppi 2888 e 2971 sono stati identificati come "scotocromogeni non identificati". Le specie del *M. avium* complex non sono scotocromogene.

Dopo risoluzione, la sensibilità globale è del 99,9%, la specificità del 100% e il tasso di concordanza del 99,9%.

Dei 148 ceppi atipici del *M. avium* complex analizzati una seconda volta dai centri di riferimento perché presentavano una difficile identificazione, 120 hanno reagito positivamente al test e 28 negativamente. Questi ceppi vengono attualmente studiati presso il CDC. Lo stato tassonomico dei ceppi atipici del *M. avium* complex è in corso di revisione da parte dell'International Working Group su Tassonomia Micobatterica.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO *M. AVIUM* COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA è stata calcolata testando due concentrazioni diverse di

RNA ribosomiale provenienti o da *M. avium*, o da *M. intracellulare*, o da specie non *M. avium* o non *M. intracellulare* del *M. avium* complex. Lo stesso campione è stato testato 12 volte in una stessa serie.

M. avium

Campione	A	B
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	67.574	112.246
Deviazione standard	2.900	3.429
Coefficiente di variazione	4,3%	3,1%

M. intracellulare

Campione	A	B
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	61.758	100.736
Deviazione standard	3.941	3.275
Coefficiente di variazione	6,4%	3,3%

M. avium complex

Campione	A	B
Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	64.148	113.049
Deviazione standard	3.384	3.249
Coefficiente di variazione	5,3%	2,9%

B. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test è stata calcolata analizzando in cieco singolo due concentrazioni diverse di RNA ribosomiale proveniente o da *M. avium*, o da *M. intracellulare*, o da specie non *M. avium*, o non *M. intracellulare* del *M. avium* complex per 10 diverse serie.

M. avium

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	65.790	125.506
Deviazione standard	4.535	9.115
Coefficiente di variazione	6,9%	7,3%

M. intracellulare

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	60.175	104.203
Deviazione standard	6.339	9.239
Coefficiente di variazione	10,5%	8,9%

M. avium complex

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	64.187	111.197
Deviazione standard	4.659	10.011
Coefficiente di variazione	7,3%	9,0%

C. SPECIFICITÀ

Sono stati analizzati in totale 122 stock-culture mediante il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI DA UNA COLTURA. Questi ceppi rappresentavano globalmente 93 specie appartenenti a 37 generi microbici diversi. È stato testato un pannello filogenetico di 3 ceppi del *M. avium* complex, 60 ceppi di altre 55 specie di micobatteri e 59 ceppi appartenenti ad altri 36 generi diversi. Solo i ceppi del *M. avium* complex hanno evidenziato un risultato positivo con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI DEL GRUPPO M. AVIUM COMPLEX ISOLATI A PARTIRE DA UNA COLTURA.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Sono state analizzate delle diluizioni di RNA ribosomiale provenienti o da *M. avium*, o da *M. intracellulare* del *M. avium* complex, le cui concentrazioni erano comprese fra $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg e $4,0 \cdot 10^{-2}$ mg per test, in presenza di 15 milioni di microrganismi appartenenti ad una delle seguenti specie: *M. terrae*, *M. simiae*, o *Nocardia asteroides*. Non è stata riscontrata alcuna interferenza o reazione incrociata.



AccuProbe

TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA

(bioMérieux ref. 39001 / Gen-Probe Cat.No. 102845/2845)

UTILIZAÇÃO

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA é um teste de identificação rápida por sonda ADN das micobactérias do complexo *Mycobacterium avium* (complexo *M. avium*) isoladas a partir de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização de ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micobactérias do complexo *M. avium* estão entre as que ocorrem com mais frequência em pacientes com SIDA ou imunodeprimidos (7, 15). A incidência patogénica do complexo *M. avium* nas doenças pulmonares crónicas é também cada vez mais importante (8, 17). Recentemente, vários laboratórios referiram que identificavam, pelo menos, tantas estirpes pertencentes ao complexo *M. avium* quantas as de *M. tuberculosis* (17). O tratamento destas infecções é difícil e a sua severidade requer um diagnóstico rápido.

O complexo *M. avium* é composto por micobactérias de crescimento lento que produzem poucos ou nenhuns pigmentos, não hidrolizam nem o TWEEN 80 nem a ureia, não reduzem os nitratos, produzem menos de 45 mm de espuma no teste semi-quantitativo da catalase e dão reacções positivas com a nicotinamidase e com a pirazinamidase. Geralmente, admite-se que o complexo *M. avium* é composto por duas espécies: *M. avium* e *M. intracellulare* (19). Os fenótipos destes dois microrganismos são praticamente idênticos e os testes bioquímicos não permitem diferenciá-los.

Os métodos utilizados normalmente para identificar as micobactérias do complexo *M. avium* incluem a cultura, a análise bioquímica, a tipagem serológica, a GLC (gas liquid chromatography), a HPLC (high performance liquid chromatography), e a utilização de sondas de ADN marcadas com isótopos que reagem com o ARN ribossómico (Sistema de Diagnóstico Rápido GEN-PROBE para o complexo *M. avium*) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Uma tipagem serológica, efectuada com soros adsorvidos contendo anticorpos dirigidos aos antígenos celulares de superfície, permite identificar a maioria das estirpes do complexo *M. avium* ou *M. intracellulare*. No entanto, estudos recentes sobre a catalase, o polimorfismo dos fragmentos de restrição e a hibridização ADN-ADN demonstraram que alguns serotipos atribuídos inicialmente a *M. intracellulare* pertenciam, na realidade, à espécie *M. avium* (1, 14, 21).

Existe, portanto, um pequeno número de estirpes identificadas no plano bioquímico como pertencendo ao complexo *M. avium*, que não podem ser classificadas com certeza absoluta pelos métodos anteriormente citados como *M. avium* ou *M. intracellulare*. O estatuto taxonómico exacto deste género de estirpes está actualmente mal definido. O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA permite detectar *M. avium*, *M. intracellulare*, e

outras estirpes recentemente identificadas como pertencendo ao complexo *M. avium*. Não permite diferenciar as espécies do complexo entre elas (20, 22, 23). Algumas estirpes raras do complexo *M. avium* podem não dar reacção positiva com este teste.

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 (11). 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 permite medir o sinal luminoso emitido pelos híbridos ADN-ARN. O resultado é positivo se o luminómetro indicar um valor superior ou igual ao valor limiar; é negativo se indicar um valor inferior.

REAGENTES

Os reagentes utilizados para o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO *M. AVIUM* ISOLADAS DE UMA CULTURA são fornecidos em três kits distintos:

KIT SONDA PARA O COMPLEXO *M. AVIUM* ACCUPROBE

<u>Reagente Sonda</u> (P)	(4 x 5 tubos)
Complexo <i>M. avium</i>	
<u>Tubo de Lise</u> (LT)	(1 x 20 tubos)
Esferas de vidro e tampão	

KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA ACCUPROBE

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

KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE

<u>Reagente de Detecção I</u> (RI)	1 x 240 ml
0,1% de peróxido de hidrogénio em ácido nítrico 0,001 N	
<u>Reagente de Detecção II</u> (RII)	1 x 240 ml
Hidróxido de sódio 1 N	

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- A. Unicamente para diagnóstico *in vitro*.
- B. Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (2).
- C. Utilizar unicamente para a identificação das micobactérias do complexo *M. avium* isoladas a partir 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 deste kit contêm azida sódica susceptível de reagir com as canalizações de chumbo ou de cobre formando azidas metálicas explosivas. Quando eliminar estes reagentes, é aconselhável diluir com bastante água para prevenir a formação de azidas na canalização.

G. Evitar o contacto dos Reagentes de Detecção I e II com a pele e com as mucosas. No caso de contacto, lavar com água. Se estes reagentes forem derramados, diluí-los com água antes de limpar.

CONSERVAÇÃO

O 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 fechada hermeticamente e os tubos devem ser utilizados num prazo de dois meses, dentro do prazo de validade.

Os outros reagentes do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA 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

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA foi concebido para identificação do complexo *M. avium* isolado a partir de uma cultura.

- A. **Identificação a partir de cultura em meio sólido.** O teste pode ser efectuado com culturas realizadas num meio sólido apropriado, como uma gelose inclinada de Löwenstein-Jensen, ou em meios de Middlebrook 7H10 ou 7H11, quando se observa uma morfologia que evoca o complexo *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 visto que as micobactérias vão ser colocadas em suspensão numa quantidade de líquido mínima.
 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. Colher com a pipeta uma amostra de 100 µl da suspensão do caldo correctamente homogeneizado, e distribuí-la no Tubo de Lise, seguindo as instruções do parágrafo PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.

MATERIAL FORNECIDO

TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA

bioMérieux ref. 39001 / GEN-PROBE Cat. No. 102845/2845

20 testes

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

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Ansas de 1 µl de plástico estéril, ansas metálicas ou agulhas de plástico para colheita das colónias

Estirpes de controlo das culturas

Banho-maria ou bloco de aquecimento (60° ± 1°C)*

Banho-maria ou bloco de aquecimento (95° ± 5°C)*

Micropipetas (100 µl, 300 µl)

Pipetas de repetição (100 µl, 300 µl)
Vortex
Padrão de Nefelometria McFarland 1

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

MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR GEN-PROBE:

Luminómetro GEN-PROBE LEADER 50i
(bioMérieux ref. 39400 / Gen-Probe Cat. No. 103100i/3100i)
Bloco de aquecimento (60° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39406 / Gen-Probe Cat. No. 3397)
Bloco de aquecimento (95° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39407 / Gen-Probe Cat. No. 3398)
Bloco de aquecimento Twin (60°/95° ± 1°C)
(bioMérieux ref. 39408 / Gen-Probe Cat. No. 3399)
Sonicador GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39409 / Gen-Probe Cat. No. 901104/T460)
Suporte de tubos para o sonicador GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39313 / Gen-Probe Cat. No. 104027/4027)
KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS ACCUPROBE
(bioMérieux ref. 39305 / Gen-Probe Cat. No. 102800/2800)
KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO GEN-PROBE
(bioMérieux ref. 39300 / Gen-Probe Cat. No. 201791/1791)

PROCEDIMENTO

A. PREPARAÇÃO DO MATERIAL

1. Encher o reservatório do sonicador com água quente até cerca de 1 cm do bordo.
2. A água do banho de ultrasons deve estar perfeitamente desgaseificada antes da manipulação para otimizar a transferência de energia dos ultrasons. Para desgaseificar completamente a água, colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Regular um bloco de aquecimento ou um banho-maria a 60° ± 1°C e um outro a 95° ± 5°C.
4. Preparar o luminómetro LEADER GEN-PROBE. Assegurar-se de que a quantidade de reagentes de Detecção I e II é suficiente para efectuar os testes.

B. CONTROLOS

As estirpes de controlo positivo e negativo devem ser testadas por rotina em cada laboratório, em conformidade com a regulamentação em vigor. Pode utilizar-se uma cultura de *M. avium* (por ex. American Type Culture Collection, ATCC 25291) ou de *M. intracellulare* (por ex. ATCC 13950) como controlo positivo, e uma cultura de *M. tuberculosis* (por ex. ATCC 25177) 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. Transferir com a pipeta 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 os Tubos de Lise identificados, seguindo as instruções dadas no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste se realizar a partir de cultura em meio sólido, agitar a ansa ou a agulha na mistura diluente com Reagente 1 e Reagente 2 de modo a 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 no local. OS TUBOS NÃO DEVEM, EM CASO ALGUM, TOCAR NO FUNDO OU NAS PAREDES DO SONICADOR.
2. Colocar o sonicador em funcionamento durante 15 minutos.
3. Em seguida, colocar os tubos que 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 a saqueta hermeticamente dobrando várias vezes a sua extremidade e fixando-a com fita-cola ou com uma pinça. **Não retirar a saqueta que contém o 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 de amostra lisada dos Tubos de Lise para os tubos de Reagente Sonda correspondentes.
4. Fechar os tubos de Reagente Sonda e colocá-los a incubar durante 15 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 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 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, enxugá-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 termo-dependentes. Consequentemente, é imperativo manter o banho-maria ou o bloco de aquecimento à temperatura preconizada.
- C. DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES: as reacções de hibridização e de selecção dependem do tempo. A hibridização deve durar, pelo menos, 15 minutos, mas não mais de 20 minutos. Durante a etapa de SELECÇÃO, incubar os tubos de Reagente Sonda durante, pelo menos, 5 minutos, mas não mais de 6 minutos.
- D. BANHO-MARIA: a água deve 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. tuberculosis*, ATCC 25177), superiores a 10.000 RLU (Relative Light Units) no LEADER ou a 300 PLU (Photometric Light Units) no ACCULDR (anteriormente PAL) se a homogeneização tiver sido insuficiente depois da adição do Reagente 3 (Reagente de Selecção), ou se estiverem presentes diversos tipos de colónias. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.
 2. Podem observar-se valores fracos de controlo positivo (*M. avium*, ATCC 25291 ou *M. intracellulare*, ATCC 13950), inferiores a 30.000 RLU no LEADER ou a 900 PLU no ACCULDR (anteriormente PAL) se o número de germes for insuficiente, se a sonicação não tiver sido correctamente efectuada ou se o teste tiver sido efectuado com culturas mistas ou antigas. Para verificar se se trata de uma cultura mista, repicar uma parte num meio gelosado apropriado e incubar.

RESULTADOS

A. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA são interpretados em função de um valor limiar. As amostras que emitam um sinal luminoso de valor superior ou igual a este limiar são consideradas positivas. Os sinais luminosos inferiores a este limiar são considerados negativos. Quando o resultado se situar na zona duvidosa, o teste deve ser repetido. Se a segunda análise der também um resultado equívoco, é necessário repicar a estirpe para verificar a sua pureza.

	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

Os controlos negativos (por ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) e positivos (par ex. *M. avium*, ATCC 25291), provenientes de um caldo de cultura ou de uma cultura em meio sólido, devem estar de acordo com os seguintes valores:

ACCULDR
(anteriormente PAL)

LEADER

Controlo negativo	< 300 PLU	< 10.000 RLU
Controlo positivo	> 900 PLU	> 30.000 RLU

Se os controlos se encontrarem fora destes valores, os resultados não devem ser levados em consideração.

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. As performances deste teste praticado directamente com amostras clínicas (urinárias, coprológicas ou respiratórias) não foram avaliadas.

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA não permite diferenciar as espécies do complexo *M. avium*. As diferentes estirpes destas espécies serão sempre identificadas como complexo *M. avium*.

Há um pequeno número de estirpes identificadas bioquimicamente, como pertencendo ao complexo *M. avium*, que não podem ser diferenciadas em *M. avium* ou *M. intracellulare*, quer pela serologia, quer pela HPLC. Algumas destas estirpes podem também não ser detectadas pelo TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA. O estatuto taxonómico exacto destas estirpes está ainda mal definido. O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA identifica as estirpes do complexo *M. avium* identificadas como tal por HPLC ou GLC. O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA pode identificar as estirpes atípicas provenientes do complexo *M. avium*, de significado clínico ainda não estabelecido.

Os resultados do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA devem ser interpretados em função de outros dados do laboratório e correlacionados com os dados clínicos.

VALORES ESPERADOS

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA foi comparado com métodos bioquímicos clássicos de identificação de cultura em três locais. O local 1 pertencia à Gen-Probe; os locais 2 e 3 eram laboratórios de referência. Foram testadas 717 estirpes do complexo *M. avium* (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare*, e 624 complexo *M. avium*) e 235 estirpes de micobactérias de 22 espécies diferentes. As estirpes foram classificadas como positivas (> 30.000 RLU) ou negativas (< 30.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 1.353 e 14.675 RLU e as culturas positivas entre 30.829 e 2.742.691 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação, é descrita abaixo.

ACCUPROBE / PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS CLÁSSICOS

ACCUPROBE Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	% de Concordância
Local 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Local 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Local 3	526	0	17	74	96,9%/100%	97,2%
Total	716	0	18	223	97,6%/100%	98,1%

Após resolução das discordâncias

ACCUPROBE / PROCEDIMENTOS BIOQUÍMICOS CLÁSSICOS

ACCUPROBE Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	% de Concordância
Local 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Local 2	146	0	1	102	99,3%/100%	99,6%
Local 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Total	716	0	2	235	99,9%/100%	99,9%

A única amostra discordante para o Local (2416) foi analisada pelo CDC de Atlanta, na Georgia, e foi identificada como complexo *M. avium* por HPLC. O antibiograma deste microrganismo e os resultados bioquímicos foram atípicos.

O Local 3 tinha, inicialmente, 17 resultados discordantes. Dois de entre eles (7755 e 5113) não tinham sido correctamente identificados e foram reidentificados por HPLC e GLC como *M. nonchromogenicum*. Três culturas, duas de entre elas mistas (4750 e 8168), e uma não-viável (0601) foram retiradas do estudo. Duas outras estirpes foram retiradas do estudo por não poderem ser identificadas com certeza absoluta como pertencendo ao complexo *M. avium*: 2344 e 5124 foram identificadas como “muito próximas do complexo *M. avium*”. 7 das 10 discordantes restantes foram novamente analisadas por HPLC no CDC. As estirpes PE09 e 6458 foram identificadas como *M. xenopi* 2, as estirpes 9714 e 8310 como complexo *M. terrae*. As estirpes 1264 e 3634 foram identificadas como *M. scrofulaceum* pelo CDC segundo os seus próprios perfis HPLC. A estirpe 1264 correspondia ao perfil SC007, e a estirpe 3634 ao perfil EM002.

A estirpe 0214 foi identificada como *M. simiae*, enquanto que a estirpe 8153 foi confirmada por HPLC como correspondendo ao perfil MAIS (*M. avium* intracellulare scrofulaceum) EM005. As estirpes 2888 e 2971 foram identificadas como “scotocromogénicas não identificadas”. As espécies do complexo *M. avium* não são scotocromogénicas.

Assim, após resolução, a sensibilidade global é de 99,9%, a especificidade de 100%, e a taxa de concordância de 99,9%.

Entre as 148 estirpes atípicas do complexo *M. avium*, testadas novamente por laboratórios de referência por serem difíceis de identificar, 120 reagiram positivamente ao teste e 28 negativamente. Estas estirpes estão actualmente a ser estudadas pelo CDC. O estatuto taxonómico das estirpes atípicas do complexo *M. avium* está também a ser revisto pelo International Working Group in Mycobacterial Taxonomy.

PERFORMANCE DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO *M. AVIUM* ISOLADAS DE UMA CULTURA foi calculada testando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico proveniente de *M. avium*, de *M. intracellulare*, ou das espécies não *M. avium* ou não *M. intracellulare* do complexo *M. avium*. A mesma amostra foi testada 12 vezes numa mesma série.

Amostra	<i>M. avium</i>	
	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	67.574	112.246
Desvio-padrão	2.900	3.429
Coefficiente de variação	4,3%	3,1%

M. intracellulare

Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	61.758	100.736
Desvio-padrão	3.941	3.275
Coefficiente de variação	6,4%	3,3%

Complexo M. avium

Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	64.148	113.049
Desvio-padrão	3.384	3.249
Coefficiente de variação	5,3%	2,9%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

A precisão inter-ensaio foi calculada testando, singularmente, duas concentrações diferentes de ARN ribossômico proveniente de *M. avium*, de *M. intracellulare*, ou das espécies não *M. avium* ou não *M. intracellulare* do complexo *M. avium*, em 10 séries distintas.

M. avium

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	65.790	125.506
Desvio-padrão	4.535	9.115
Coefficiente de variação	6,9%	7,3%

M. intracellulare

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média(RLU)	60.175	104.203
Desvio-padrão	6.339	9.239
Coefficiente de variação	10,5%	8,9%

Complexo M. avium

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	64.187	111.197
Desvio-padrão	4.659	10.011
Coefficiente de variação	7,3%	9,0%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 122 estirpes ATCC com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA. Estas estirpes compreendiam 93 espécies de 37 géneros diferentes. Foi analisado um painel filogenético de 3 estirpes do complexo *M. avium*, 60 estirpes de 55 outras espécies micobacterianas e 59 estirpes de 36 outros géneros. Unicamente as estirpes do complexo *M. avium* deram um resultado positivo com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DAS MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. AVIUM ISOLADAS DE UMA CULTURA.

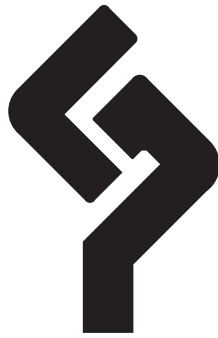
D. TESTE DE SOBRECARGA

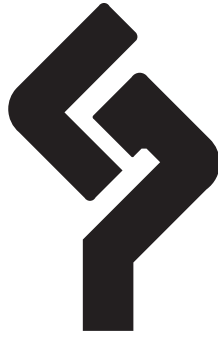
Foram testadas diluições de ARN ribossômico proveniente de *M. avium*, de *M. intracellulare*, ou das espécies não *M. avium* ou não *M. intracellulare* do complexo *M. avium*, cujas concentrações estavam compreendidas entre $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg e $4,0 \cdot 10^{-2}$ mg por teste, na presença de 15 milhões de microrganismos pertencentes a uma das seguintes espécies: *M. terrae*, *M. simiae*, ou *Nocardia asteroides*. Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada.

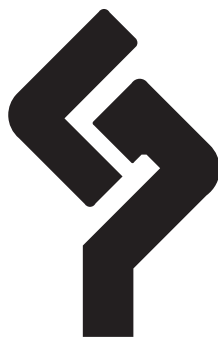
BIBLIOGRAPHY BIBLIOGRAPHIE LITERATUR BIBLIOGRAPHIEA


1. **Baess, I.** 1983. Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*. Acta. Path. Microbiol. Scand. **91**: 201-223.
2. **Center for Disease Control.** 1988. United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep. **37**: 377-382, 387-388.
3. **Conville, P.S., J.F. Keiser, and F.G. Witebsky.** 1989. Mycobacteremia caused by simultaneous infection with *M. avium* and *M. intracellulare* detected by analysis of a BACTEC 13A bottle with the GEN-PROBE kit. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **12**: 217-219.
4. **Drake, T.A., J.A. Hindler, O.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.
5. **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.
6. **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.
7. **Guthertz, L.S., B. Damsker, E.J. Bottone, E.G. Ford, T.F. Midura, and J.M. Janda.** 1989. *M. avium* and *M. intracellulare* infections in patients with and without AIDS. J. Infect. Dis. **160**: 1037-1041.
8. **Horowitz, E.A.** 1988. Recent trends in mycobacterial disease. Hosp. Formul. **23**: 892-897.
9. **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.
10. **Klehn, 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.
11. **Kohne, D.E., A.G. Steigerwalt, and D.J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus legionella. pp. 1-371. In C. Thornsberrry, A. Balows, J.C. Feely, and W. Jukubowski (ed.), Legionella: proceedings of the 2nd international symposium. Washington, D.C.
12. **Musial, C.E., L.S. Tice, L. Stockman, and D. Roberts.** 1988. Identification of mycobacteria from culture using Gen-Probe rapid diagnostic system for *M. avium* complex and *M. tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. **26**: 2120-2123.
13. **Peterson, E.M., R. Lu, C. Floyd, A. Nakasone, G. Friedly, and L.M. De La Maza.** 1989. Direct identification of *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. J. Clin. Microbiol. **27**: 1543-1547.
14. **Picken, R.N., A.Y. Tsang, and H.L. Yang.** 1988. Speciation of organisms within the *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* (MAIS) complex based on restriction fragment length polymorphisms. Mol. and Cell Probes. **2**: 289-304.
15. **Pitchinck, A.E., D. Fertel, and A.B. Bloch.** 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. Clin. Chest. Med. **9**: 425-441.
16. **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.
17. **Saubolle, M.A.** 1989. Nontuberculosis mycobacteria as agents of human disease in the United States. Clin. Microbio. News **11**: 113-117.
18. **Sherman, I., N. Harrington, A. Rothrock, and H. George.** 1989. Use of a cutoff range in Identifying mycobacteria by the Gen-Probe rapid diagnostic system. J. Clin. Microbiol. **27**: 241-244.
19. **Sommers, H.M., and R.C. Good.** 1985. Mycobacterium, p. 216-248. In E.H. Lennette et al (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 4th edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

20. **Wasen, C.F., C.M. McCarthy, and L.W. Murray.** 1991. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of the *M. avium* Complex and other Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 264-271.
21. **Wayne, L.G., and G.A. Diaz.** 1986. Differentiation between T-catalases derived from *M. avium* and *M. intracellulare* by a solid phase Immunosorbent assay. *Intl. J. of System Bact.* **36**: 363-367.
22. **Wayne, L.G., R.C. Good, M.I. Krichevsky, Z. Blacklock, H.L. David, D. Dawson, W. Gross, J. Hawkins, V. Vincent Levy-Frebault, C. McManus, F. Portaels, S. Rusch-Gerdes, K.H. Schroder, V.A. Silcox, M. Tsukamura, K. van den Breen, and M.A. Yakrus.** 1991. Fourth report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the international working group on mycobacterial taxonomy. *Intl. J. of System Bact.* **41**: 463-472.
23. **Wayne, L.G., and H.A. Sramek.** 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 1-25.









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



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

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

102902F-01 Rev. F 2011-03
©1990 - 2011 Gen-Probe Incorporated