

AccuProbe®

TEST DO IDENTYFIKACJI MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE Z KULTURY BAKTERYJNEJ

TYLKO DO UŻYTKU NA EKSPORT
(bioMérieux ref. 39004 / Hologic Cat. No. 102840)

ZASTOSOWANIE

TEST DO IDENTYFIKACJI MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE Z KULTURY BAKTERYJNEJ ACCUPROBE jest szybkim testem zawierającym sondę DNA, który wykorzystuje technikę hybrydizacji kwasów nukleinowych do identyfikacji *Mycobacterium intracellulare* wyizolowanego z kultury bakteryjnej.

OPIS I WYJAŚNIENIE ZASADY TESTU

Mycobacterium intracellulare (*M. intracellulare*) jest przedstawicielem *Mycobacterium avium* complex (*M. avium* complex) składającego się z grupy organizmów, których związek taksonomiczny jest niejasny i kontrowersyjny, ale których patogenność dla człowieka jest niezaprzeczalna (16). *M. intracellulare* został opisany jako istotny czynnik chorobowy mający szczególne znaczenie u pacjentów z obniżoną odpornością (12). Leczenie tych zakażeń jest trudne, a ciężki przebieg infekcji wymaga szybkiej diagnostyki. W dodatku w niektórych laboratoriach zachorowalność z powodu *M. avium* complex jest rozpoznawana równie często jak z powodu *M. tuberculosis*.

Klasyczne metody identyfikacji mykobakterii są wykonywane w oparciu o barwienie preparatów sporządzonych z próbek od pacjentów w kierunku obecności pałeczek kwasoopornych, następnie sporządzenie hodowli i przeprowadzenie testów biochemicznych. Określenie gatunku wyizolowanego *Mycobacterium* przy użyciu tych standardowych metod hodowlanych może trwać długo, nawet do dwóch miesięcy (8).

Ogólnie przyjmuje się, że *M. avium* complex składa się z dwóch gatunków: *M. avium* i *M. intracellulare*. Jednakże fenotypowo *M. avium* i *M. intracellulare* są właściwie nie do odróżnienia, również testy biochemiczne nie są w stanie wykazać różnic między nimi.

Do identyfikacji *M. avium* i *M. intracellulare* okazała się użyteczna Wysokociśnieniowa Chromatografia Gazowa (HPLC) (3), jednakże, jest ona czasochłonna i nie jest łatwo dostępna dla większości laboratoriów.

Metody serologiczne mogą być również stosowane do identyfikacji szczepów *M. intracellulare* i *M. avium*, przy użyciu antygeny i surowicy, znalazły one zastosowanie w badaniach epidemiologicznych. Jednakże, serotypowanie nie jest ogólnie dostępne co limituje postępowanie z pacjentem. Aktualnie jest 28 ogólnie akceptowanych serotypów w obrębie *M. avium* complex i w różnych okresach czasu różnymi serotypami oznaczano indywidualne szczepy *M. avium* i *M. intracellulare*. Historycznie przyjmuje się, że serotypy od 1 do 3 należą do *M. avium*, podczas gdy serotypy od 4 do 28 należą do *M. intracellulare* (15).

W kilku badaniach, Baess wykorzystywała hybrydizację DNA:DNA do wyjaśnienia taksonomicznego związku między tymi dwoma gatunkami. Na podstawie swoich analiz Baess doszła do wniosku, że serotypy 4,5,6 i 8, które wcześniej zostały zaklasyfikowane jako *M. intracellulare*, obecnie zostały przypisane gatunkowi *M. avium*. Przynależność serotypu 9 jest niejasna (1, 2).

Saito wraz z współpracownikami również wykorzystali sondę DNA i zaproponowali usystematyzowanie tych 28 serotypów w następujący sposób: serotypy 1 do 6, 8 do 11, i 21 jako przynależne do *M. avium*; serotypy 7, 12 do 20, i 25 jako przynależne do *M. intracellulare*, serotypy 22 do 28 (z wyjątkiem serotypu 25) wykazywały właściwości heterogenetyczne i nie można było ich zaliczyć do konkretnego gatunku (13). W dodatku, niektórych szczepów nie udało się wytypować serologicznie, a kilka aglutynowało więcej aniżeli z jednym przeciwciałem.

Inne opublikowane wyniki badań dotyczące wykorzystania sondy DNA do różnicowania gatunkowego w obrębie *Mycobacterium avium* complex dotyczą również zastosowania sondy DNA do badań epidemiologicznych i w celu geograficznego rozmieszczenia *M. avium* i *M. intracellulare* (5-7, 9, 11, 14).

TEST DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE identyfikuje *M. intracellulare* izolowane z hodowli z przygotowanej próbki w czasie krótszym niż jedna godzina. Identyfikacja jest oparta o wykrywanie sekwencji specyficznego rybosomalnego RNA, który jest typowy dla *M. intracellulare*. TEST DO IDENTYFIKACJI KULTURY

MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE oferuje szybką, obiektywną i dokładną identyfikację *M. intracellulare* wyizolowanego z hodowli.

ZASADY TESTU

Testy hybrydyzacji kwasów nukleinowych są oparte na zdolności specyficznego łączenia się komplementarnej nici kwasu nukleinowego w stabilne dwuniciowe kompleksy (10). System AccuProbe wykorzystuje jednoniciową sondę DNA znakowaną chemiluminescencyjnie, która jest komplementarna do rybosomalnego RNA docelowego organizmu. Po uwolnieniu rybosomalnego RNA z organizmu, znakowana sonda DNA łączy się z docelowym rybosomalnym RNA organizmu w stabilną DNA:RNA hybrydę. Odczynnik do Selekcji pozwala na zróżnicowanie niezhybrydyzowanej i zhybrydyzowanej sondy. Znakowane hybrydy DNA:RNA są oznaczane w luminometrze Hologic. Pozytywny wynik jest odczytywany w luminometrze jako równy lub wyższy aniżeli punkt odcięcia. Wartość poniżej tego punktu odcięcia daje wynik negatywny.

ODCZYNNIKI

Uwaga: Aby uzyskać informacje dotyczące zagrożeń oraz oświadczenia o środkach ostrożności w postępowaniu z odczynnikami, należy skorzystać z Safety Data Sheet Library [Biblioteki Kart Charakterystyki Bezpieczeństwa Substancji] pod adresem www.hologic.com/sds.

Odczynniki do TESTU ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DO IDENTYFIKACJI KULTURY są dostarczone w trzech oddzielnych zestawach:

ZESTAW ZAWIERAJĄCY SONDĘ MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE

Odczynnik Zawierający Sondę (P)	(4 x 5 probówek)
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	
Probówki do Lizy (LT)	(1 x 20 probówki)
Perełki szklane i bufor	

ODCZYNNIKI DO IDENTYFIKACJI KULTURY ACCUPROBE

Odczynnik 1 (Odczynnik do Lizy) (1)	1 x 10 mL
Zbuforowany roztwór zawierający 0.04% azydku sodu	
Odczynnik 2 (Bufor do Hybrydyzacji) (2)	1 x 10 mL
Zbuforowany Roztwór	
Odczynnik 3 (Odczynnik do Selekcji) (3)	1 x 60 mL
Zbuforowany Roztwór	

ODCZYNNIKI HOLOGIC DO DETEKЦИИ

Odczynnik do Detekcji I (RI)	1 x 240 mL
0.1% woda utleniona w 0.001 N. kwasie azotowym	
Odczynnik do Detekcji II (RII)	1 x 240 mL
1 N wodorotlenek sodu	

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Stosować powszechnie używane środki ostrożności w trakcie wykonywania tego testu (4).
- Stosować wyłącznie do identyfikacji *M. intracellulare* wyizolowanego z kultury.
- Używać wyłącznie dostarczonych lub specyficznych dla pracy laboratorium wyrobów jednorazowych.
- Przesiewy z hodowli i wszystkie kroki związane z postępowaniem z hodowlą łącznie z inaktywacją przez podgrzewanie powinny być wykonywane w Laboratorium II Klasy Zabezpieczenia Biologicznego.
- Odczynniki w tym teście zawierają azydek sodu, który może się łączyć z ołowiem lub miedzią w potencjalnie wybuchowe związki metalu. Przed usunięciem tych odczynników, zawsze należy rozcieńczyć materiał dużą ilością wody aby zapobiec niepożądanym reakcjom.
- Unikać kontaktu Odczynników do Odczytu I i II ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli doszło do kontaktu skóry z odczynnikami, przemyć to miejsce obficie wodą. Jeżeli odczynniki rozlały się, należy rozcieńczyć je wodą przed wytarciem powierzchni.

PRZECHOWYWANIE TESTU I WYMAGANIA HANDLOWE

Probówki zawierające Odczynnik z Sondą muszą być przechowywane w foliowych saszetkach w temp. 2° do 8°C. Probówki z Odczynnikiem zawierającym Sondę, jeżeli saszetka nie była otwierana, zachowują stabilność zgodnie z datą ważności. Raz otwarta saszetka powinna być ponownie szczelnie zamknięta, probówki powinny być zużyte w ciągu dwóch miesięcy i przed upływem daty ważności.

Inne Odczynniki używane w Teście DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE mogą być przetrzymywane w temp. między 2° a 25°C i zachowują stabilność zgodnie z datą ważności.
NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

TEST DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE jest przeznaczony do identyfikacji *M. intracellulare* izolowanego z kultury.

- A. **Hodowla na Podłożu Stałym.** Uzyskany wzrost na podłożach stałych takich jak: skosy Lowensteina-Jensena, Middlebrooka 7H10 lub na płytkach 7H11, wizualnie przypominający *M. intracellulare* należy poddać badaniu. Próbki mogą być badane bezpośrednio po zaobserwowaniu wzrostu oraz podczas następných sześćdziesięciu dni inkubacji.
1. Wzrost należy zebrać 1 µl jednorazową plastikową lub metalową eżą albo plastikową igłą. Nie należy używać wymazówek, z uwagi na zbyt małą objętość cieczy, w której znajdują się komórki.
 2. Unikać pobrania stałego podłoża razem z komórkami.
 3. Osoba prowadząca badanie w tym czasie może wybrać kolonie z innej płytki w celu potwierdzenia czystości izolatu.
- B. **Hodowla bulionowa.** Wzrost na podłożu bulionowym Middlebrooka 7H9 o gęstości równej lub większej od 10 Standardu Nefelometrycznego McFarlanda może być badany Testem DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE. Należy pobrać pipetą 100µl próbki z dobrze wymieszanej zawiesiny bulionowej i przenieść do Probówek z Odczynnikami do Lizy, jak opisano poniżej.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE CULTURE IDENTIFICATION TEST

bioMérieux ref. 39004 / Hologic Cat. No. 102840

Odczynnik Zawierający Sondę (P)
Probówki do Lizy (LT)

20 testów

4 x 5 probówek
1 x 20 probówek

MATERIAŁY WYMAGANE LECZ NIE DOSTARCZONE W ZESTAWIE

1 µl plastikowe sterylne ezy do posiewów, ezy metalowe lub plastikowe igły do selekcji kolonii

Szczepy do Kontroli Hodowli

Łaźnia wodna lub sucha łaźnia* (60° ± 1°C)

Łaźnia wodna lub sucha łaźnia* (95° ± 5°C)

Mikropipety (100 µl, 300 µl)

Repipetor (100 µl, 300 µl)

Mieszadło Vortex

McFarland 1^o standard nefelometryczny

*Blok grzejny w suchej łaźni powinny mieć otwory dostosowane do ogrzewania probówek o rozmiarach 12 x 75 mm. Zaleca się używanie suchej łaźni Hologic.

PRODUKTY DOSTĘPNE U DYSTRYBUTORA HOLOGIC

Luminometr Hologic Leader 50i

(bioMérieux ref. 39400 / Hologic Cat. No. 103100i)

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39305 / Hologic Cat. No. 102800)

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

(bioMérieux ref. 39300 / Hologic Cat. No. 201791)

Sucha łaźnia (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406)

Sucha łaźnia (95° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39407)

Sucha łaźnia podwójna (60°/95° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39408)

Sonikator Hologic

(bioMérieux ref. 39409 / Hologic Cat. No. 901104)

Statyw do Sonikatora Hologic

(bioMérieux ref. 39313 / Hologic Cat. No. 104027)

WYKONANIE TESTU

A. PRZYGOTOWANIE SPRZĘTU

1. W celu swobodnego przepływu ultradźwięków, woda musi być dokładnie odgazowana zgodnie z następującym postępowaniem:
 - a. Napełnić sonikator gorącą wodą, tak aby do górnej krawędzi pozostał 1 cm.
 - b. Uruchomić sonikator na 15 min. w celu dokładnego odgazowania wody.
2. Dostosować jeden blok grzejny lub łaźnię wodną do temp. $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i następny blok grzejny lub łaźnię wodną do temp. $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
3. Przygotować luminometr Hologic Leader do pracy. Upewnić się, że jest wystarczająca ilość Odczynników do Odczytu I i II do wykonania testu.

B. SZCZEPY KONTROLNE

1. Szczepy używane do kontroli pozytywnej i negatywnej powinny być zbadane rutynowo w każdym laboratorium zgodnie z miejscowymi przepisami. Hodowla *M. intracellulare* (np., American Type Culture Collection, ATCC #13950) może być używana jako kontrola pozytywna, natomiast hodowla *M. avium* (np., ATCC # 25291) może być używana jako kontrola negatywna.

C. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

1. Oznaczyć odpowiednim numerem Probówki z Odczynnikiem Lizującym przeznaczone do badania wyizolowanych hodowli i/lub kontroli. Zdjąć i zatrzymać koreczki.
2. Odpipetować 100 μl Odczynnika 1 (Odczynnika do Lizy) i 100 μl Odczynnika 2 (Buforu do Hybrydyzacji) do wszystkich próbek z Odczynnikiem Lizującym. **Jeżeli będzie badana hodowla bulionowa, nie należy dodawać Odczynnika 1 do Probówek z Odczynnikiem Lizującym .**
3. Przenieść próbkę szczepu ze stałego podłoża lub 100 μl dobrze wymieszanej hodowli bulionowej do oznaczonych Probówek z Odczynnikiem Lizującym tak, jak opisano w dziale POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK. Ruchem wirowym zamieszać eżą lub igłą mieszaninę Odczynnika 1 i Odczynnika 2 przygotowując w ten sposób zawiesinę z uwolnionych komórek, jeżeli badany wzrost pochodzi ze stałego podłoża.
4. Zamknąć Probówki z Odczynnikiem Lizującym i krótko wymieszać mieszadłem Vortex.

D. LIZA PRÓBEK

1. Wcisnąć Probówki z Odczynnikiem Lizującym do Statywu Sonikatora w ten sposób aby mieszanina reakcyjna była zanurzona w wodzie, a nakrętki próbek znajdowały się powyżej poziomu wody. Umieścić Statyw w łaźni wodnej sonikatora. **NIE POZWALAĆ ABY PROBÓWKI DOTYKAŁY DNA LUB ŚCIANEK SONIKATORA.**
2. Sonikować przez 15 minut.
3. Umieścić Probówki z Odczynnikiem do Lizy zawierające zsonikowane organizmy w bloku grzejnym lub łaźni wodnej na 10 minut w temp. $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
4. Ostrożnie wyjąć Probówki z Odczynnikiem do Lizy z bloku grzejnego lub łaźni wodnej.

E. HYBRYDYZACJA

1. Otworzyć foliową saszetkę przecinając ją równoległe do górnej krawędzi. Wyjąć odpowiednią liczbę Probówek z Sondą do zbadania izolatów z hodowli i/lub kontroli. Zamknąć ponownie saszetkę przez zagięcie kilkakrotnie otwartej krawędzi saszetki i zabezpieczyć taśmą samoprzylepną lub klipsem. **Pozostawić torebkę z substancją osuszającą wewnątrz saszetki.**
2. Ponumerować odpowiednią liczbę Probówek z Odczynnikiem zawierającym Sondę przeznaczonych do zbadania izolatów z hodowli i/lub kontroli. Zdjąć i zachować koreczki.
3. Odpipetować 100 μl zlizowanych próbek z Probówek z Odczynnikiem Lizującym do odpowiednich Probówek z Odczynnikiem zawierającym Sondę.

4. Zamknąć Probówki z Odczynnikami z Sondą i inkubować przez 15 minut w temp. $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ w łaźni wodnej lub bloku grzejnym.

F. SELEKCJA

1. Wyjąć Probówki z Odczynnikami z Sondą z łaźni wodnej lub z bloku grzejnego. Zdjąć i zachować koreczki. Odpipetować po 300 μl Odczynnika 3 (Odczynnik do Selekcji) do każdej probówki. Zamknąć probówki i bardzo dokładnie je wymieszać mieszadłem Vortex.
2. Inkubować probówki z Odczynnikami z Sondą przez 5 minut w temp. $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ w łaźni wodnej lub bloku grzejnym.
3. Wyjąć probówki z Odczynnikami z Sondą z łaźni wodnej lub bloku grzejnego i pozostawić je w temperaturze pokojowej przez następne 5 minut. Zdjąć i wyrzucić koreczki. **Odczytać wyniki w luminometrze w ciągu jednej godziny.**

G. ODCZYTYWANIE WYNIKÓW

1. Należy wybrać właściwy program z oprogramowania luminometru.
2. Używając wilgotnej chusteczki lub papierowego ręcznika, należy wytrzeć każdą probówkę w celu usunięcia pozostałości z zewnętrznej ścianki probówek i wstawić probówkę do luminometru zgodnie z instrukcją obsługi aparatu.
3. Po zakończeniu odczytu, wyjąć probówkę(i) z luminometru.

UWAGI PRAKTYCZNE

- A. ODCZYNNIKI: Odczynnik 2 (Bufor do Hybrydyzacji) może się wytrącić. Podgrzewanie i mieszanie roztworu w temp. od 35°C do 60°C pozwoli na rozpuszczenia precypitatu.
- B. TEMPERATURA: Reakcja Hybrydyzacji i Selekcji są zależne od temperatury. Dlatego konieczne jest aby temperatura łaźni wodnej lub bloku grzejnego była utrzymywana w odpowiednim zakresie.
- C. CZAS: Reakcja Hybrydyzacji i Selekcji są zależne od czasu. Hybrydyzacja trwa co najmniej 15 minut ale nie dłużej niż 20 minut. Inkubacja Probówek z Odczynnikami zawierającym Sondę podczas SELEKCJI trwa co najmniej 5 minut ale nie dłużej niż 6 minut.
- D. ŁAŹNIA WODNA: Poziom wody w łaźni wodnej powinien być utrzymywany, tak aby zapewnić zanurzenie Probówek z Odczynnikami Lizującym, jednak nie powinien sięgać powyżej zaznaczonego pierścienia. Należy również zapewnić całkowite zanurzenie w wodzie płynnej części reakcyjnej Probówek z Odczynnikami zawierającym Sondę.
- E. WYTRZAŚANIE: Bardzo istotne jest uzyskanie homogennej mieszaniny podczas PRZYGOTOWYWANIA PRÓBEK oraz podczas etapów SELEKCJI, zwłaszcza po dodaniu komórek do Odczynnika 1 i 2 oraz po dodaniu Odczynnika 3.
- F. ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

1. Podwyższone wartości kontroli negatywnej (*M. avium* ATCC # 25291) powyżej 10,000 RLU (Względne jednostki światła) w LUMINOMETRZE Leader lub 300 PLU (Fotometryczne jednostki światła) w aparacie AccuLDR (poprzednio PAL) mogą być spowodowane niewystarczającym wymieszaniem próbki po dodaniu odczynnika 3 (Odczynnik do Selekcji) lub na skutek badania mieszanych hodowli. Ze względu na możliwość występowania mieszanych hodowli, część wzrostu należy przesiać na odpowiednie podłoże agarowe i inkubować w celu sprawdzenia namnożonych typów kolonii.
2. Niskie wartości kontroli pozytywnej (*M. intracellulare* ATCC # 13950) niższe od 30,000 RLU w LUMINOMETRZE Leader lub 900 PLU w AccuLDR (poprzednio PAL) mogą być spowodowane niewystarczającą liczbą komórek, niewłaściwą sonikacją lub badaniem mieszanych albo starych hodowli. Ze względu na możliwość występowania mieszanych hodowli, część wzrostu należy przesiać na odpowiednie podłoże agarowe i inkubować w celu sprawdzenia typów namnożonych kolonii.

WYNIKI

A. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki TESTU ACCUPROBE DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE opierają się na następujących wartościach punktów odcięcia /cut-off/. Próbki emitujące sygnały wyższe lub równe tym wartościom, są uznawane jako dodatnie. Próbki emitujące sygnały niższe aniżeli wartość tego punktu odcięcia są uznawane jako ujemne. Wyniki w powtarzających się zakresach powinny być powtórzone.

	AccuLDR (poprzednio PAL)	Leader
Wartość punktu odcięcia	900 PLU	30,000 RLU
Zakres do powtórzenia	600 - 899 PLU	20,000-29,999 RLU

B. KONTROLA JAKOŚCI I AKCEPTOWANIE WYNIKÓW

Kontrola ujemna (np., *M. avium* ATCC # 25291) i kontrola dodatnia (np., *M.intracellulare* ATCC # 13950), powinny wykazywać następujące wartości:

	AccuLDR (poprzednio PAL)	Leader
Kontrola ujemna	< 300 PLU	< 10,000 RLU
Kontrola dodatnia	> 900 PLU	> 30,000 RLU

OGRANICZENIA

Metoda została przetestowana przy użyciu młodej kultury wyhodowanej na stałym lub płynnym podłożu jak opisano w części pt. POBIERANIE I OPRACOWYWANIE PRÓBEK. Skuteczności testu nie badano przy użyciu bezpośrednich materiałów klinicznych takich jak: (np., moczu, stolcu, wydzielina z układu oddechowego).

Wyniki Testu ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DO IDENTYFIKACJI KULTURY powinny być interpretowane w zestawieniu z innymi laboratoryjnymi i klinicznymi wynikami dostępnymi dla lekarza klinicysty.

OCZEKIWANE WARTOŚCI

TEST ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DO IDENTYFIKACJI KULTURY był porównywany w dwóch ośrodkach do standardowych hodowlanych i biochemicznych metod stosowanych do identyfikacji kultury. Ośrodek 1 i 2 przebadaly ogółem 259 izolatów; 109 izolatów *M. intracellulare* i 147 izolatów z 19 innych szczepów *Mycobacterium*. Standardowe metody identyfikacji kultury są uzależnione od intensywności wzrostu, morfologii kolonii, badania mikroskopowego i serii reakcji biochemicznych. Dodatkowo wyniki Testu ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DO IDENTYFIKACJI KULTURY były porównywane z wynikami Wysokociśnieniowej Chromatografii Cieczowej (HPLC) w 3 ośrodku przy użyciu 97 szczepów *Mycobacterium*.

Metodą HPLC zidentyfikowano 31 izolatów jako *M. intracellulare*, 36 izolatów jako *M. avium* i 36 izolatów reprezentujących inne szczepy *Mycobacterium*. W badaniu Testem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE DO IDENTYFIKACJI KULTURY wszystkie izolaty były jednoznacznie pozytywne ($\geq 30,000$ RLU) lub negatywne ($< 30,000$ RLU). Zakres wyników dla kultur negatywnych wynosił od 266 do 3,405 RLU i od 33,851 do 559,708 RLU dla kultur pozytywnych. Porównanie uzyskanych wyników do standardowej metody hodowlanej (Ośrodek 1 i 2) i metody HPLC (Ośrodek 3) są pokazana poniżej.

ACCUPROBE / IDENTYFIKACJA METODĄ HODOWWLI I HPLC

AccuProbe Hodowla	Poz Poz	Poz Neg	Neg Poz	Neg Neg	Czulość Specyficzność	Procent Zgodności
Ośrodek 1	28	0	0	50	100%/100%	100%
Ośrodek 2	81	0	0	100	100%/100%	100%
Ośrodek 3	31	0	0	66	100%/100%	100%
Ogółem	140	0	0	216	100%/100%	100%

CHARAKTERYSTYKA PROCESÓW

A. POWTARZALNOŚĆ

Powtarzalność przebiegu TESTU DO IDENTYFIKACJI HODOWLI MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE obliczano na podstawie ANALIZY dwóch stężeń rybosomalnego RNA wyizolowanego z *M. intracellulare* stosując 10 powtórzeń dla pojedynczego oznaczenia.

Mycobacterium intracellulare

Próbka	A	B
Liczba powtórzeń	10	10
Średnia wartość impulsu	39,179	71,587
Odchylenie standardowe	764	2,123
Współczynnik zmienności	2.0%	3.0%

B. ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność oceniano na podstawie analizy takich samych dwóch stężeń rybosomalnego RNA *M.intracellulare* stosując 12 kolejnych powtórzeń dla dla jednej próby.

Mycobacterium intracellulare

Próbka	A	B
Liczba powtórzeń	12	12
Średnia wartość impulsu	37,541	72,189
Odchylenie standardowe	3,318	4,352
Współczynnik zmienności	8.8%	6.0%

C. SWOISTOŚĆ

Ogółem oceniono 106 ATCC izolatów hodowlanych przy użyciu TESTU DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE. Te izolaty reprezentowały 91 gatunków z 39 rodzajów. Przy pomocy tego testu oznaczono pięć izolatów *M. intracellulare*, 37 izolatów z 25 innych gatunków *Mycobacterium* i 64 izolaty z 38 innych rodzajów reprezentujących przekrój filogenetyczny organizmów. Jedynie izolaty *Mycobacterium intracellulare* badane przy użyciu TESTU DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE dawały pozytywny wynik. Inne gatunki *Mycobacterium* oraz izolaty spokrewnione filogenetycznie nie reagowały w tym teście.

D. ODZYSKIWANIE

Rybosomalne RNA *M. intracellulare* w stężeniu od $5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ to $1 \times 10^{-1} \mu\text{g}$ na jeden test było analizowane w obecności 15 mln. komórek *Mycobacterium tuberculosis*, *M. simiae*, lub *Nocardia asteroides*. Nie zaobserwowano interferencji między sygnałem *M. intracellulare* i innymi badanymi organizmami w TESTIE DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE ACCUPROBE.

BIBLIOGRAFIA

1. **Baess, I.** 1983. Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 91:201-203.
2. **Baess, I.** 1979. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. ACTA Path. Microbiol. Scand. Sect. B. 87:221-226.
3. **Butler, W.R. and J.O. Kilburn.** 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and *M. gordonae* by high performance liquid chromatography of their mycolic acids. J. Clin. Microbiol. 26:50-53.
4. **Centers for Disease Control.** 1988. United States Morbid. And Mortal. Weekly Rep. 37:377-382, 387-388.
5. **Drake, T.A., J.A. Hindler, G.W. Berlin and D.A. Bruckner.** 1987. Rapid identification of *M. avium* complex in culture using DNA probes. J. Clin. Microbiol. 25:1442-1445.
6. **Ellner, P.D., T.E. Kiehn, R. Cammarata and M. Hosmer.** Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J. Clin. Microbio. 26:1349-1352.
7. **Gonzalez, R. And B.A. Hanna.** 1987. Evaluation of Gen-Probe DNA hybridization systems for the identification of *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 8:69-77.
8. **Kent, P.T. and G.P. Kubica.** 1985. Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory, U.S. Department of Public Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
9. **Kiehn, T.E. and F.F. Edwards.** 1987. Rapid identification using a specific DNA probe of *M. avium* complex from patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. 25:1551-1552.
10. **Kohne, D.E., A.G. Steigerwalt and D.J. Brenner.** 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus Legionella, p 107-108. In C. Thornsberry, et al. (ed.) Legionella: proceedings of the 2nd international symposium. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. **Musial, C.E., L.S. Tice, L. Stockman and G.D. Roberts.** 1988. Identification of Mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *M. avium* complex and *M. tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 26:2120-2123.
12. **Pitchenik, A.E., D. Fertel and A.B. Block.** 1988. Mycobacterial disease: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. Clin. Chest. Med. 9:425-441.
13. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka and D. Dawson.** 1990. Identification of various serovar strains of *M. avium* and *M. intracellulare*. J. Clin. Microbiol. 28:1694-1997.
14. **Saito, H., H. Tomioka, K. Sato, H. Tasaka, M. Tsukamura, F. Kuze and K. Asano.** 1989. Identification and partial characterization of *M. avium* and *M. intracellulare* by using DNA probes. J. Clin. Microbiol. 27:994-997.
15. **Schaefer, W.B.** 1965. Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Respir. Dis. 92(Supl.):85-93.
16. **Sommers, H.M. and R.C. Good.** 1985. M., p. 216-248. In E.H. Lennette, et al. (ed.) Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Hologic, Inc.
10210 Genetic Center Drive
San Diego, CA 92121 (USA)



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

Opisywany produkt może być objęty co najmniej jednym patentem USA,
przedstawionym na stronie www.hologic.com/patents.

102901F-01-PL Rev. 003

©1990 - 2018 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.
2018-03