



AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM KANSASII
CULTURE IDENTIFICATION TEST**
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

**MYCOBACTERIUM KANSASII
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**
(bioMérieux Best.Nr. 39003 / Hologic Kat. Nr. 102855)

**TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII
ISOLE D'UNE CULTURE**
(bioMérieux réf. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

**TEST DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII
AISLADO DE UN CULTIVO**
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

**TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII
ISOLATO DA UNA CULTURA**
(bioMérieux cod. 39003 / Hologic Cat. N. 102855)

**TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII
ISOLADO DE UMA CULTURA**
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM KANSASII
CULTURE IDENTIFICATION TEST**

FOR EXPORT USE ONLY
(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

Intended Use

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

Summary and Explanation of the Test

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) is a slow-growing photochromogenic bacterium that causes chronic human pulmonary disease resembling tuberculosis (1). Disseminated infections caused by non-tuberculous mycobacteria such as *M. kansasii* are becoming an increasing public health concern with the expansion of the AIDS epidemic across the United States (2). *M. kansasii* accounted for 3.5% of the pathogenic isolates reported to the Centers for Disease Control in 1980 (3).

The endemic source of *M. kansasii* is unknown. Extensive soil sampling has failed to isolate *M. kansasii* while some strains have been isolated from water (1).

Classical methods for identification of Mycobacterium species rely on staining specimens for acid-fast bacilli followed by culture, colony and cell morphology, growth rate and subsequent biochemical testing. *M. kansasii* cells are moderately long to long acid fast rods. Colonies range from flat to raised with irregular edges and smooth to rough morphology. *M. kansasii* colonies are typically nonpigmented when grown in the dark and turn lemon yellow after exposure to light (photochromogenic). Prolonged light exposure may induce production of dark red β -carotene crystals on the surface and inside of the colonies. Biochemical reactions include positive results for nitrate reduction, tween hydrolysis, urea hydrolysis, and catalase activity. It could take as long as two months to speciate a Mycobacterium isolate using these standard methods (1, 4).

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST offers a rapid, non-subjective and accurate method of identification of *M. kansasii* isolated from culture. Colonies may be identified as soon as growth is visible. The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST identifies *M. kansasii* organisms isolated from culture in less than an hour.

Principles of the Procedure

Nucleic acid hybridization tests are based on the ability of complementary nucleic acid strands to specifically align and associate to form stable double-stranded complexes (5). 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 Hologic 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

Note: For information on any hazard and precautionary statements that may be associated with reagents, refer to the Safety Data Sheet Library at www.hologic.com/sds.

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

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII PROBE KIT

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

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

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

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

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

Warnings and Precautions

- A. For *in vitro* diagnostic use.
- B. Use universal laboratory precautions when performing this assay (6).
- C. Use only for the determination of *M. kansasii* 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 KANSASII 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 KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST is designed to determine the identity of *M. kansasii* 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. kansasii* 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 KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST. Pipette a 100 µL sample from the well-mixed broth suspension into the Lysing Reagent Tube as described below.

Materials Provided

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST (*bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855*)

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

Materials Required But Not Provided

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

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

Available From Your Hologic Distributor:

	Cat. No.
Hologic Leader 50i Luminometer (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i
Hologic Sonicator (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104
AccuProbe Culture Identification Reagent Kit (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800
Hologic Detection Reagent Kit (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791
Dry Heat Bath (60° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	

	Cat. No.
Dry Heat Bath (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	
Twin Dry Heat Bath (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	
Hologic Sonicator Rack (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027

Test Procedure

A. EQUIPMENT PREPARATION

1. For optimal transfer of sonic energy, water must be thoroughly degassed according to the following procedure:
 - a. Add enough hot water to fill the sonicator bath to within 1 cm of the top of the tank.
 - b. Run the sonicator for 15 minutes to thoroughly degas the water.
2. Adjust one heating block or water bath to 60° ± 1°C and another heating block or water bath to 95° ± 5°C.
3. Prepare the Hologic 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 kansasii* (e.g., American Type Culture Collection, ATCC #12478) 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 completely mix.
2. Incubate the Probe Reagent Tubes for 8 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 of completion of the test.**

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 heating block is maintained within the specified temperature range.
- C. TIME: The Hybridization and Selection reactions are time dependent. Hybridize at least 15 minutes but no more than 20 minutes. Incubate the Probe Reagent Tubes during the SELECTION Step for at least 8 minutes but no more than 9 minutes.
- D. WATER BATH: The level of water in the water bath should be maintained to ensure that the Lysing Reagent Tubes are submerged up to, but not above, the level of the sealing ring. It should also be ensured that the entire liquid reaction volume in the Probe Reagent Tubes is submerged.
- E. VORTEXING: It is critical to have a homogenous mixture during the SAMPLE PREPARATION, and SELECTION Steps, specifically after the addition of cells to Reagents 1 and 2 and after addition of Reagent 3.
- F. TROUBLE-SHOOTING:
 - 1. Elevated negative control values (*M. tuberculosis*, ATCC #25177) greater than 10,000 RLU (Relative Light Units) in the Leader Luminometer or 300 PLU (Photometric Light Units) in the AccuLDR (formerly PAL) Luminometer can be caused by insufficient mixing after adding Reagent 3 (Selection Reagent) or by testing mixed cultures. Because mixed cultures can occur, a portion of the growth may be streaked onto the appropriate agar medium and incubated to check for multiple colony types.
 - 2. Low positive control values (*M. kansasii*, ATCC #12478) less than 30,000 RLU in the Leader Luminometer or 900 PLU in the AccuLDR (formerly PAL) Luminometer 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 KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST are based on the following cut-off values. Samples producing signals greater than or equal to these cut-off values are considered positive. Signals less than these cut-off values are considered negative. Results in repeat ranges should be repeated.

	AccuLDR (formerly PAL)	Leader
Cut-off value	900 PLU	30,000 RLU
Repeat range	600-899 PLU	20,000-29,999 RLU

B. QUALITY CONTROL AND ACCEPTABILITY OF RESULTS

Negative control (e.g., *M. tuberculosis*, ATCC #25177) and positive control (e.g., *M. kansasii*, ATCC #12478) should satisfy the following values:

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

Limitations

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

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

Expected Values

The ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST was compared to standard culture identification methods at five sites using a total of 535 isolates. These isolates represent 353 *M. kansasii* isolates and 182 isolates of 50 other *Mycobacterium* species. Standard culture identification included growth rate, colony and cell morphology (photochromogenic characteristics), microscopic examination, HPLC (high pressure liquid chromatography) and biochemical determinations. The isolates were categorized as either positive (>30,000 RLU) or negative (<30,000 RLU). The range of observations for negative cultures was 1,156 to 26,655 RLU and 1,615 to 1,181,622 RLU for positive cultures. A comparison of these results to standard culture identification methods is shown below.

AccuProbe/CULTURE IDENTIFICATION						
AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivity/ Specificity	Percent Agreement
Site 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Site 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Site 3	27	6	1	6	96.4%/50%	82.5%
Site 4	96	0	4	102	96.0%/100%	98.0%
Site 5	32	0	2	0	94.1%/N/A	94.1%
Total	340	6	7	182	98.0%/96.8%	97.6%

Six AccuProbe positive, culture negative isolates from Site 3 were sent to the Centers for Disease Control and Prevention for HPLC analysis. All six had been originally identified as *M. gastri*, but following the HPLC analysis were re-identified as *M. kansasii*. The sensitivity and specificity from Site 3 are 97.1% and 100%, respectively.

The overall sensitivity, specificity and percent agreement upon repeat testing are 98%, 100% and 98.7%, respectively.

Performance Characteristics

A. WITHIN-RUN PRECISION

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

Sample	A	B
Number of Replicates	10	10
Mean Response	55,496	103,798
Standard Deviation	3,542	3,829
Coefficient of Variation	6.4%	3.7%

B. BETWEEN-RUN PRECISION

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

Sample	A	B
Number of Replicates	12	12
Mean Response	58,001	110,715
Standard Deviation	3,698	6,825
Coefficient of Variation	6.4%	5.8%

C. SPECIFICITY

A total of 148 ATCC reference isolates were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST. These isolates represented a total of 136 species representing 44 genera. Eleven isolates of *M. kansasii*, 64 isolates of 62 other *Mycobacterium* species and 78 isolates from 43 other genera representing a wide phylogenetic cross-section of organisms were evaluated using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST. All *Mycobacterium kansasii* isolates tested produced positive reactions using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST. All other *Mycobacterium* species and non-target genera and species, representing a phylogenetic cross-section, produced negative results using the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST.

D. RECOVERY

M. kansasii ribosomal RNA at concentrations ranging from 1×10^{-4} μg and 5×10^{-1} μg per test was assayed in the presence of 30 million cells of the following non-target species: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* or *Nocardia asteroides*. The presence of these non-target species did not interfere with the positive signal of the *M. kansasii* rRNA dilutions, nor did they generate a positive reaction alone with the ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII CULTURE IDENTIFICATION TEST.

HOLOGIC®

AccuProbe®

**MYCOBACTERIUM KANSASII
KULTURBESTÄTIGUNGSTEST**
(bioMérieux Best.Nr. 39003 / Hologic Kat. Nr. 102855)

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND TESTERKLÄRUNG

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) ist ein langsam wachsendes photochromogenes Bakterium, das beim Menschen eine chronische, tuberkuloseähnliche Lungenentzündung hervorrufen kann (1). Disseminierte Infektionen, verursacht durch atypische Mykobakterien wie z.B. *M. kansasii*, werden mit der Ausbreitung der AIDS-Epidemie in den Vereinigten Staaten zunehmend zu einem Problem der öffentlichen Gesundheit (2). Bei 3,5% der pathogenen Stämme, die 1980 dem Centers for Disease Control gemeldet wurden, handelte es sich um *M. kansasii* Stämme (3).

Das endemische Reservoir von *M. kansasii* ist unbekannt. Bei umfangreichen Bodenuntersuchungen konnte *M. kansasii* nicht isoliert werden, währenddessen einige Stämme aus Wasser isoliert wurden (1).

Die klassischen Methoden zum Nachweis von *Mycobacterium* Spezies basieren auf der Säurefestigkeitsfärbung und anschließender Kultur, Kolonie- und Zellmorphologie, Wachstumsgeschwindigkeit und der biochemischen Identifizierung. *M. kansasii* sind mittellange bis lange säurefeste Stäbchen. Die Kolonien sind flach bis erhaben mit unregelmäßigem Rand und glatter bis rauher Oberfläche. Typischerweise wächst *M. kansasii* im Dunkeln unpigmentiert, unter Lichteinwirkung nehmen die Kolonien eine zitronengelbe Färbung an (photochromogene Bakterien). Eine längere Lichteinwirkung kann zur Bildung dunkelroter β -Carotin-Kristalle auf der Oberfläche und in den Kolonien führen. Zu den biochemischen Reaktionen gehören die Nitratreduktion (positiv), die Hydrolyse Tween und Harnstoff sowie die Katalase-Aktivität. Die Identifizierung eines *Mycobacterium*-Stammes mittels dieser Standardmethoden kann bis zu 2 Monate dauern (1, 4).

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST weist *M. kansasii* schnell und zuverlässig aus der Kultur nach. Die Kolonien können identifiziert werden, sobald Wachstum sichtbar ist. Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST identifiziert *M. kansasii* aus Kulturisolaten innerhalb von 1 Stunde.

PRINZIP

Die Nukleinsäure-Hybridisierungstests basieren auf der Fähigkeit komplementärer Nukleinsäuresequenzen spezifisch zu hybridisieren und stabile Doppelstrang-Komplexe zu bilden (5). Der AccuProbe Test enthält eine einzelsträngige DNA-Sonde, an die ein Chemilumineszenz-marker gekoppelt ist. Diese Sonde ist der rRNA der Zielsequenz komplementär. Nachdem die rRNA des Zielorganismus freigesetzt ist, verbindet sich die Sonde mit dieser und bildet einen stabilen DNA-RNA Komplex. Ein Selektionsreagenz baut den Chemilumineszenzmarker der ungebundenen Sonde ab, während der Marker der gebundenen Sonde intakt bleibt. Das Hologic 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

Hinweis: Informationen zu eventuell mit den Reagenzien verbundenen Gefahren- und Vorsichtshinweisen finden Sie in der Sicherheitsdatenblatt-Sammlung (Safety Data Sheet Library) unter www.hologic.com/sds.

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

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII SONDEN-TESTKIT

Sondenreagenz (P) <i>Mycobacterium kansasii</i>	(4 x 5 Röhrchen)
Lysereagenz (LT) <i>Glaskügelchen und Puffer</i>	(1 x 20 Röhrchen)

ACCUPROBE KULTURBESTÄTIGUNGS-REAGENZIENKIT

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

HOLOGIC DETEKTIONS-REAGENZIENKIT

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

- A. Nur für die *in vitro* Diagnostik verwenden.
- B. Beachten Sie die üblichen Vorsichtsmaßnahmen (6).
- C. Verwenden Sie diesen Test nur zur Identifizierung von *M. kansasii* 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 MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTESTS sind bei 2° - 25°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

DIE REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.

PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST dient zur Identifizierung von *M. kansasii* aus Kulturisolaten.

- A. **Feste Kulturmedien.** Verwenden Sie Kulturen, die auf geeigneten Medien (z.B. Löwenstein Jensen-Schrägagar oder Middlebrook 7H10 oder 7H11 Platten) angezüchtet wurden und bei denen der Verdacht besteht, daß es sich um *M. kansasii* Bakterien handelt. Sie können die Kulturen testen, sobald Wachstum sichtbar wird oder während der folgenden 60-tägigen Inkubationszeit.
 1. Teile des Zellrasens mit einer 1 µl Einweg-Plastiköse, einer Metallöse oder einer Einweg-Plastiknadel abnehmen. Verwenden Sie wegen des geringen Flüssigkeitsvolumens, in dem die Mykobakterien anschließend gelöst werden, keinen Wattetupfer.
 2. Achten Sie darauf, daß beim Abnehmen der Kultur kein Nährboden mit abgenommen wird.

3. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Möglichkeit, eine weitere Platte zu beimpfen, um die Reinheit der entnommenen Probe zu überprüfen.

B. **Flüssige Kulturmedien.** Der Test kann mit Middlebrook 7H9 Bouillonkulturen durchgeführt werden, deren Trübung gleich oder größer ist als McFarland Standard 1. Pipettieren Sie 100 µl Probe aus dem gut gemischten Flüssigkulturmedium in ein Lyseröhrchen, wie im Abschnitt PROBEN- VORBEREITUNG beschrieben.

MITGELIEFERTE MATERIALIEN

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST (*bioMérieux Best.Nr. 39003 / Hologic Kat. Nr. 102855*)

20 Tests	
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* ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

Wasserbad oder Heizblock* ($95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$)

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 Hologic zu verwenden.

ZUSÄTZLICH VERFÜGBARE MATERIALIEN:

	Kat. Nr.
Hologic Leader 50i Luminometer (<i>bioMérieux Best.Nr. 39400</i>)	103100i
Hologic Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39409</i>)	901104
ACCUPROBE REAGENZIENKIT KULTURBESTÄTIGUNG (<i>bioMérieux Best.Nr. 39305</i>)	102800
HOLOGIC DETEKTIONS-REAGENZIENKIT (<i>bioMérieux Best.Nr. 39300</i>)	201791
Heizblock ($60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39406</i>)	

	Kat. Nr.
Heizblock (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39407</i>)	
Doppelheizblock (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux Best.Nr. 39408</i>)	
Hologic Röhrchenständer für das Ultraschallbad (<i>bioMérieux Best.Nr. 39313</i>)	104027

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 Hologic 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 kansasii* Kultur (z.B. American Type Culture Collection, ATCC 12478) dienen, während eine *Mycobacterium tuberculosis* Kultur (z.B. ATCC 25177) als negative Kontrolle 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, so daß möglichst viele Zellen in das Röhrchen übertragen werden

4. Die Lyseröhrchen gut verschließen und kurz VORTEXEN.

D. LYSIEREN DER PROBEN

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

E. HYBRIDISIERUNG

1. Die Folienbeutel am oberen Ende aufschneiden. Entnehmen Sie die für die Proben und/oder Kontrollen erforderliche Anzahl an Sondenöhrchen. Den Beutel an der geöffneten Seite mehrfach umschlagen und mit Klebeband oder einer Klammer wieder dicht verschließen. **Den Trockenbeutel nicht herausnehmen.**
2. Beschriften Sie eine ausreichende Anzahl Sondenöhrchen für die 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 Sondenöhrchen.
4. Verschließen Sie die Sondenöhrchen und inkubieren Sie diese für 15 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder Heizblock.

F. SELEKTION

1. Nehmen Sie die Sondenöhrchen aus dem Wasserbad oder Heizblock. Entfernen Sie die Stopfen und bewahren Sie diese auf. Pipettieren Sie 300 μl Reagenz 3 (Selektionsreagenz) in jedes Röhrchen. Verschließen Sie die Röhrchen und vortexen Sie diese, um den Inhalt gleichmäßig zu durchmischen.
2. Inkubieren Sie die Sondenöhrchen für 8 min bei $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad oder einem Heizblock.
3. Nehmen Sie die Sondenöhrchen aus dem Wasserbad oder dem Heizblock und lassen Sie sie für mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen. Entfernen Sie die Stopfen. **Die Röhrchen innerhalb der nächsten Stunde im Luminometer messen.**

G. DETEKTION

1. Wählen Sie auf dem Luminometer das geeignete Programm.
2. Zur Säuberung der Röhrchenwand sowie zur Vermeidung von elektrostatischen Einflüssen während der Messung durch das Röhrchenmaterial selbst, sollte jedes Röhrchen vor der Messung mit einem feuchten Tuch bzw. Papier abgewischt

werden. Stellen Sie die Röhrrchen gemäß den Angaben im Handbuch in das Luminometer.

3. Nehmen Sie die Röhrrchen 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: Hybridisierung und Selektion sind temperatur-abhängige 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 zeit-abhängige Reaktionen. Die Hybridisierungsdauer sollte nicht unter 15 min liegen, jedoch 20 min nicht überschreiten. Die Sondenröhrrchen während des SELEKTIONSSCHRITTES mindestens 8 min, jedoch nicht länger als 9 min inkubieren.
- D. WASSERBAD: Ein gleichbleibend hoher Wasserstand ist wichtig, so daß die Röhrrchen mit dem Lysereagenz bis zum Dichtungsring ins Wasser reichen, jedoch nicht darüber hinaus. Achten Sie darauf, daß sich die gesamte Reaktionslösung der Sondenröhrrchen im Wasser befindet.
- E. VORTEXEN: Während der Arbeitsschritte PROBEN-VORBEREITUNG 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 Luminometer 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 Luminometer 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. kansasii* ATCC 12478) unter 30.000 RLU auf dem Luminometer Leader oder 900 PLU auf dem Luminometer AccuLDR (vormals PAL) erhält man bei zu geringen Keimzahlen, falscher Beschallung oder durch Testen von Mischkulturen oder zu alter Kulturen. Um festzustellen, ob eine Mischkultur vorliegt, können Sie einen Teil der Kultur auf ein geeignetes Kulturmedium überimpfen und inkubieren.

ERGEBNISSE

A. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Grenzwert	900 PLU	30.000 RLU
Graubereich	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. QUALITÄTSKONTROLLE UND VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE

Die negative Kontrolle (z.B. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) und die positive Kontrolle (z.B. *M. kansasii*, ATCC 12478) müssen folgenden Sollwerten entsprechen:

	AccuLDR (vormals PAL)	Leader
Negativkontrolle	<300 PLU	<10.000 RLU
Positivkontrolle	>900 PLU	>30.000 RLU

LIMITIERUNGEN

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

Die Ergebnisse des ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST müssen in Zusammenhang mit anderen Testergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.

NORMALWERTE

Der ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurde in 5 Labors mit klassischen Identifizierungsmethoden verglichen. Hierfür wurden insgesamt 535 Stämme getestet: 353 *M. kansasii* Stämme und 182 Stämme von 50 anderen *Mycobacterium* Spezies. Die klassischen Identifizierungsmethoden umfaßten die Wachstumsgeschwindigkeit, Kolonien- und Zellmorphologie (photochromogene Eigenschaften), mikroskopische Untersuchung, die HPLC (high pressure liquid chromatography) und biochemische Identifizierung. Die Stämme wurden entweder als positiv (> 30.000 RLU) oder negativ (< 30.000 RLU) bewertet. Für die negativen Kulturen wurde ein Bereich von 1.156 bis 26.655 RLU ermittelt, die Ergebnisse der positiven Kulturen lagen zwischen 1.615 und 1.181.622 RLU. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den klassischen Identifizierungsmethoden ist im folgenden angegeben.

AccuProbe /KULTUR						
AccuProbe Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrelation

AccuProbe /KULTUR						
AccuProbe Kultur	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensitivität/ Spezifität	Prozent. Korrelation
Labor 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Labor 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Labor 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Labor 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98%
Labor 5	32	0	2	0	94,1%/N/A	94,1%
Gesamt	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

6 AccuProbe positive, Kultur-negative Isolate aus Labor 3 wurden zur HPLC Analyse an das Centers for Disease Control and Prevention geschickt. Alle 6 Stämme waren ursprünglich als *M. gastris* identifiziert worden, wurden jedoch nach der HPLC Analyse als *M. kansasii* identifiziert. Die Sensitivität und die Spezifität in Labor 3 beträgt jeweils 97,1% und 100%.

Die Sensitivität, die Spezifität und die prozentuale Korrelation in allen 5 Laboren zusammen betrug nach wiederholter Testung 98%, 100% bzw. 98,7%.

PERFORMANCE

A. INTRA-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Intra-Assay Präzision des ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden zwei Konzentration der rRNA von *M. kansasii* 10 Mal in einer Testserie bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	10	10
Mittelwert	55.496	103.798
Standardabweichung	3.542	3.829
Variationskoeffizient	6,4 %	3,7 %

B. INTER-ASSAY PRÄZISION

Zur Bestimmung der Inter-Assay Präzision wurden die gleichen zwei Konzentrationen der rRNA von *M. kansasii* in Einzelbestimmungen in 12 aufeinanderfolgenden Testserien bestimmt.

Probe	A	B
Anzahl Tests	12	12
Mittelwert	58.001	110.715
Standardabweichung	3.698	6.825
Variationskoeffizient	6,4 %	5,8 %

C. SPEZIFITÄT

Insgesamt wurden 148 ATCC Referenzstämme mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST getestet. Bei diesen

Stämmen handelte es sich um 136 Spezies von 44 Gattungen. 11 *M. kansasii* Stämme, 64 Stämme von 62 anderen *Mycobacterium* Spezies und 78 Stämme von 43 anderen Gattungen, die einen breiten phylogenetischen Querschnitt von Organismen darstellten, wurden mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST evaluiert. Alle getesteten *Mycobacterium kansasii* Stämme reagierten mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST positiv. Alle anderen *Mycobacterium*-Spezies sowie Gattungen und Spezies aus dem phylogenetischen Querschnitt, die keine rRNA-Zielsequenzen besitzen, reagierten mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST negativ.

D. WIEDERFINDUNG

M. kansasii rRNA wurde in Konzentrationen von 1×10^{-4} µg und 5×10^{-1} µg pro Test in Gegenwart von 30 Millionen Zellen getestet, die zu einer der folgenden Spezies gehören: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Nocardia asteroides*. Bei der Testung mit dem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM KANSASII KULTURBESTÄTIGUNGSTEST wurden keine Interferenzen oder Kreuzreaktionen festgestellt.

HOLOGIC®

AccuProbe®

TEST D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE

(bioMérieux réf. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

UTILISATION

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

INTRODUCTION

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) est une bactérie photochromogène à croissance lente, responsable chez l'homme d'une maladie pulmonaire chronique proche de la tuberculose (1). La propagation des infections liées aux mycobactéries atypiques (non tuberculeuses) telles que *M. kansasii* pose un véritable problème de santé publique directement lié au développement de l'épidémie de SIDA (2). Aux Etats-Unis, en 1980, *M. kansasii* représentait 3,5% des souches pathogènes signalées aux Centers for Disease Control (3).

Le réservoir naturel de *M. kansasii* est inconnu. Des prélèvements telluriques ont été effectués de manière extensive mais n'ont donné aucun résultat, alors que quelques souches ont pu être isolées de l'eau (1).

Les méthodes classiques d'identification des mycobactéries reposent sur la recherche bacilles acido-alcoolo-résistants par la coloration de Ziehl-Nielsen, suivie de la mise en culture, de l'étude de la morphologie des colonies et des cellules, de la mesure du taux de croissance, et de l'analyse biochimique. *M. kansasii* est un bacille en forme de bâtonnet plus ou moins long, acido-alcoolo-résistant. Les colonies ont un aspect variable: planes ou bombées, avec des contours irréguliers et une surface lisse ou rugueuse. Les colonies de *M. kansasii* n'ont aucune pigmentation lorsqu'elles poussent dans l'obscurité, et prennent une coloration jaune-citron lorsqu'elles sont exposées à la lumière (photochromogénicité). L'exposition prolongée à la lumière peut induire la production de cristaux de β -carotène rouge foncé, à la surface et à l'intérieur des colonies. Au plan biochimique, *M. kansasii* réduit les nitrates, hydrolyse le tween et l'urée et réagit positivement au test de la catalase. Deux mois peuvent être nécessaires à l'identification d'une souche de mycobactérie en utilisant ces méthodes traditionnelles (1, 4).

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII permet une identification rapide, précise et objective de *M. kansasii* isolé à partir d'une culture. Les colonies peuvent être identifiées dès que la prolifération est visible. L'identification prend moins d'une heure.

PRINCIPE

Les tests par hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité de brins complémentaires d'acides nucléiques à s'apparier de manière spécifique pour former des complexes bicaténaires stables (5). 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 Hologic 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

Remarque : Pour obtenir des informations sur les mentions de danger et de mise en garde qui pourraient être associées à ces réactifs, consultez la Safety Data Sheet Library (Bibliothèque des fiches techniques de sécurité) à l'adresse www.hologic.com/sds.

Les réactifs utilisés pour le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE sont fournis dans trois coffrets distincts:

COFFRET SONDE POUR MYCOBACTERIUM KANSASII ACCUPROBE

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

COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURE ACCUPROBE

Réactif 1 (Réactif de Lyse) (1) <i>Solution tamponnée contenant 0,04% d'azide de sodium.</i>	1 x 10 ml
Réactif 2 (Tampon d'Hybridation) (2) <i>Solution tamponnée.</i>	1 x 10 ml
Réactif 3 (Réactif de Sélection) (3) <i>Solution tamponnée.</i>	1 x 60 ml

COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION HOLOGIC

Réactif de Détection I (RI) <i>0,1% d'eau oxygénée dans de l'acide nitrique 0,001 N.</i>	1 x 240 ml
Réactif de Détection II (RII) <i>Hydroxide de sodium 1 N.</i>	1 x 240 ml

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- A. Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- B. Observer les précautions habituelles lors de la réalisation de ce test (6).
- C. A utiliser uniquement pour l'identification de *M. kansasii* isolé à partir d' une culture.
- D. Utiliser uniquement le matériel fourni ou du matériel à usage unique.
- E. La manipulation des cultures et toutes les étapes du procédé jusqu' à l'étape d'inactivation par la chaleur doivent être effectuées dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe II.
- F. Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium susceptible de former, par réaction avec le plomb ou le cuivre des canalisations, des azides métalliques explosifs. Lors de l'évacuation de ces réactifs, prendre soin de toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d' azide dans la plomberie.
- G. Eviter 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 à l'eau avant d'essuyer.

CONSERVATION

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

Les autres réactifs du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE peuvent être conservés entre 2° et 25°C, et restent stables jusqu'à la date de péremption.

NE PAS CONGELER LES RÉACTIFS.

PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE L' ÉCHANTILLON

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE est conçu pour déterminer l'identité de *M. kansasii* isolé à partir d' une culture.

- A. **Identification à partir de culture sur milieu solide.** Le test peut être pratiqué sur des cultures réalisées sur un milieu solide approprié, comme une gélose inclinée de Löwenstein-Jensen, ou des milieux de Middlebrook 7H10 ou 7H11, lorsqu'on observe une morphologie évocatrice de *M. kansasii*. 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 öse en plastique jetable de 1 µl, d'une öse métallique, ou d'une aiguille en plastique jetable. Ne pas utiliser d'écouvillon en raison de la faible quantité de liquide dans lequel les mycobactéries vont être remises en suspension.

2. Eviter de prélever du milieu de culture avec les mycobactéries.
3. Manipulateur peut à ce stade décider d'ensemencer un autre milieu de culture pour confirmer la pureté de l'échantillon isolé.

B. Identification sur bouillon de culture. Le test peut être pratiqué sur des cultures en bouillon de Middlebrook 7H9 possédant une turbidité supérieure ou égale à 1 McFarland.

Prélever à la pipette un échantillon de 100 µl de la suspension du bouillon parfaitement homogénéisé, et le distribuer dans le tube de Lyse en suivant les instructions du paragraphe PREPARATION DE L'ECHANTILLON.

MATÉRIEL FOURNI

TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE

bioMérieux réf. 39003 / Hologic Cat. No. 102855

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

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Öses de 1 µl en plastique stérile, öses 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 Hologic est recommandée.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DISPONIBLE CHEZ VOTRE DISTRIBUTEUR HOLOGIC

	Cat. No.
Luminomètre Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux réf. 39400</i>)	103100i
Sonicateur Hologic (<i>bioMérieux réf. 39409</i>)	901104
COFFRET DE RÉACTIFS POUR IDENTIFICATION DE CULTURES ACCUPROBE (<i>bioMérieux réf. 39305</i>)	102800

	Cat. No.
COFFRET DE RÉACTIFS DE DÉTECTION HOLOGIC (<i>bioMérieux réf. 39300</i>)	201791
Bloc chauffant (60° ± 1°C) (<i>bioMérieux réf. 39406</i>)	
Bloc chauffant (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux réf. 39407</i>)	
Bloc chauffant Twin (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux réf. 39408</i>)	
Portoir de tubes pour le sonicateur Hologic (<i>bioMérieux réf. 39313</i>)	104027

MODE OPERATOIRE

A. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

1. Remplir le réservoir du sonicateur d'eau chaude jusqu' à environ 1 cm du bord.
2. L'eau du bain à ultrasons doit être parfaitement dégazée avant la manipulation afin d'optimiser le transfert d'énergie des ultrasons. Pour dégazer l'eau entièrement, faire fonctionner le sonicateur pendant 15 minutes.
3. Régler un bloc chauffant ou un bain-marie à 60° ± 1 °C et un autre bloc chauffant ou bain-marie à 95° ± 5 °C.
4. Préparer le luminomètre Hologic. 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 *Mycobacterium kansasii* (par ex. American Type Culture Collection, ATCC 12478) comme contrôle positif, et une culture de *Mycobacterium tuberculosis* (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 bouillon de culture, ne pas ajouter de Réactif 1 dans les Tubes de Lyse.**
3. Transférer l'échantillon provenant du milieu solide ou 100 µl du bouillon de culture correctement homogénéisé dans les Tubes de Lyse, suivant les instructions données dans le paragraphe PRELEVEMENT ET PRÉPARATION DE

L'ÉCHANTILLON. Si le test est réalisé sur une culture en milieu solide, agiter l'öse ou l'aiguille dans la solution pour remettre les cellules en suspension.

4. Reboucher les Tubes de Lyse et les agiter brièvement à l'aide d'un VORTEX.

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

F. SÉLECTION

1. Retirer les tubes de Réactif Sonde du bain-marie ou du bloc chauffant. Ôter et conserver les bouchons. Distribuer 300 µl de Réactif 3 (Réactif de Sélection) dans chaque tube. Reboucher les tubes et les agiter à l'aide d'un VORTEX pour obtenir un mélange homogène.
2. Faire incuber les tubes de Réactif Sonde pendant 8 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 8 minutes mais pas plus de 9 minutes.
- D. BAIN-MARIE: le niveau d'eau doit être suffisamment élevé pour que les Tubes de Lyse soient immergés jusqu' à l'anneau de fermeture, mais pas au-dessus. S'assurer également que la totalité du liquide de réaction se trouvant dans les tubes de Réactif Sonde soit immergée.
- E. UTILISATION DU VORTEX: il est essentiel de disposer d'un mélange homogène durant les étapes de PRÉPARATION de L'ÉCHANTILLON et de SÉLECTION, particulièrement après l'addition des microorganismes aux Réactifs 1 et 2, et après addition du Réactif 3.
- F. RESOLUTION D'INCIDENTS
 1. Des valeurs élevées de contrôle négatif (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), supérieures à 10.000 RLU (Relative Light Units) sur le Luminomètre Leader ou à 300 PLU (Photometric Light Units) sur le Luminomètre 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. kansasii*, ATCC 12478), inférieures à 30.000 RLU le Luminomètre Leader ou à 900 PLU sur le Luminomètre AccuLDR (anciennement PAL) peuvent être observées lorsque le nombre de germes est insuffisant, lorsque la sonication n'est pas correctement effectuée, ou lorsque le test est réalisé sur des cultures mixtes ou âgées. Pour vérifier s'il s'agit d'une culture mixte, on peut en repiquer une partie sur un milieu gélosé approprié et la mettre à incuber.

RÉSULTATS

A. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE sont interprétés en fonction d'une valeur seuil.

Les échantillons produisant un signal lumineux de valeur supérieure ou égale à ce seuil sont considérés comme positifs. Les signaux lumineux inférieurs à ce seuil sont considérés comme négatifs. Lorsque le résultat est situé dans la zone d'incertitude, le test doit être répété. Si la seconde analyse donne toujours des résultats équivoques, il faut repiquer la souche afin de vérifier sa pureté.

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Valeur seuil	900 PLU	30.000 RLU
Zone d'incertitude	600-899 PLU	20.000-29.999 RLU

B. CONTRÔLE DU QUALITÉ ET ACCEPTABILITÉ DES RESULTATS

Les contrôles négatifs (par ex. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) et positifs (par ex. *M. kansasii*, ATCC 12478) doivent satisfaire aux valeurs suivantes:

	AccuLDR (anciennement PAL)	Leader
Contrôle négative	<300 PLU	<10.000 RLU
Contrôle positif	>900 PLU	>30.000 RLU

LIMITES DU TEST

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

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

VALEURS ATTENDUES

Le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE a été comparé à des méthodes classiques de culture avec identification biochimique sur cinq sites différents en analysant au total 535 souches. Ont été testées : 353 souches de *M. kansasii* et 182 souches de 50 autres espèces de mycobatéries. Les méthodes classiques d'identification reposent sur l'étude de la morphologie des cellules et des colonies (caractéristiques photochromogènes), sur l'examen microscopique, l'HPLC (high pressure liquid chromatography) et sur une série de réactions biochimiques.

Les souches ont été déterminés soit positives (> à 30.000 RLU), soit négatives (< à 30.000 RLU) à l'aide du test AccuProbe. Les observations ont montré que les cultures négatives avaient une valeur comprise entre 1.156 et 26.655 RLU et les cultures positives entre 1.615 et 1.181.622 RLU. La comparaison de ces résultats avec les méthodes classiques d'identification figure ci-dessous :

AccuProbe/ CULTURE						
AccuProbe Culture	Pos Pos	Pos Nég	Nég Pos	Nég Nég	Sensibilité/ Spécificité	Taux de Concordance
Site 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Site 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Site 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Site 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98,0%
Site 5	32	0	2	0	94,1%/NA	94,1%
Total	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

Six AccuProbe résultat positif, culture-négative du site 3 ont été envoyés au Centre de Prévention et Contrôle des maladies infectieuses pour analyse HPLC. Tous les 6 avaient été identifiés comme étant originellement *M. gastri*, mais suite à l'analyse HPLC, ils ont été identifiés comme étant *M. kansasii*. La sensibilité et la spécificité du Site 3 sont de 97,1% et 100% respectivement.

La sensibilité, la spécificité moyenne et le taux de concordance après répétition des tests sont donc de 98,0 %, 100 % et 98,7 % respectivement.

PERFORMANCES DU TEST

A. PRÉCISION INTRA-ESSAI

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

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	10	10
Réponse moyenne (RLU)	55.496	103.798
Ecart-type	3.542	3.829
Coefficient de variation	6,4%	3,7%

B. PRÉCISION INTER-ESSAI

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

Échantillon	A	B
Nombre d'essais	12	12
Réponse moyenne (RLU)	58.001	110.715
Ecart-type	3.698	6.825
Coefficient de variation	6,4%	5,8%

C. SPÉCIFICITÉ

Un total de 148 souches de cultures ATCC a été étudié à l'aide du TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE. Ces souches comprenaient 136 espèces issues de 44 genres différents. Un panel phylogénétique 11 souches de *M. kansasii*, 64 souches de 62 autres espèces de mycobactéries et 78 souches issues de 43 autres genres a été testé. Seules les souches de *M. kansasii* ont donné un résultat positif avec le TEST ACCUPROBE D'IDENTIFICATION DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLE D'UNE CULTURE. Tous les autres microorganismes ont donné un résultat négatif.

D. TEST DE SURCHARGE

Des dilutions d'ARN ribosomal de *M. kansasii* dont les concentrations étaient comprises entre 1×10^{-4} µg et 5×10^{-1} µg par test ont été testées en présence de 30 millions de microorganismes appartenant aux espèces non-cibles suivantes: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Nocardia asteroides*. Aucune interférence ni réaction croisée n'a été observée.

HOLOGIC®

AccuProbe®

TEST DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII AISLADO DE UN CULTIVO

(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

UTILIZACIÓN

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII aislado de un cultivo es un test rápido con sonda de DNA que utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de *Mycobacterium kansasii* aislado de un cultivo.

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) es una bacteria fotocromógena de crecimiento lento, responsable en el hombre de una enfermedad pulmonar crónica próxima a la tuberculosis (1). La propagación de las infecciones relacionadas con las micobacterias atípicas (no tuberculosas) como la *M. kansasii* representa un verdadero problema de salud pública directamente vinculado al desarrollo de la epidemia de SIDA (2). En 1980, en Estados Unidos, *M. kansasii* representaba el 3,5% de las cepas patógenas detectadas en los Centers for Disease Control (3).

No se conoce la reserva natural de *M. kansasii*. Se han efectuado tomas telúricas de manera extensiva pero sin resultado, mientras que se han podido aislar algunas cepas del agua (1).

Los métodos clásicos de identificación de las micobacterias reposan sobre la búsqueda de bacilos ácido-alcohol-resistentes mediante la tinción de Ziehl-Nielsen, seguida de la puesta en cultivo, del estudio de la morfología de las colonias y de las células, de la medida de la tasa de crecimiento, y del análisis bioquímico. *M. kansasii* es un bacilo en forma de bastoncillo más o menos largo, ácido-alcohol-resistente. Las colonias tienen un aspecto variable: planas o abombadas, con contornos irregulares y una superficie lisa o rugosa. Las colonias de *M. kansasii* no tienen ninguna pigmentación cuando crecen en la oscuridad, y toman una coloración amarillo limón cuando están expuestas a la luz (fotocromogenicidad). La exposición prolongada a la luz puede inducir la producción de cristales de β -caroteno rojo oscuro, en la superficie y en el interior de las colonias. En el plano bioquímico, *M. kansasii* reduce los nitratos, hidroliza el Tween y la urea, y reacciona positivamente al test de la catalasa. Se pueden necesitar dos meses para identificar una cepa de micobacteria utilizando estos métodos tradicionales (1, 4).

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII permite una identificación rápida, precisa y objetiva de *M. kansasii* aislado a partir de un cultivo. Las colonias pueden ser identificadas desde que el crecimiento sea visible. La identificación requiere menos de una hora.

PRINCIPIO

Los tests por hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para aparearse de modo específico, formando

complejos bicatenarios estables (5). El método AccuProbe utiliza una sonda de DNA monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del RNA ribosómico (rRNA) del organismo diana. Cuando el rRNA 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 Hologic 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

Nota: Para obtener información sobre cualquier aviso de riesgo o precaución que pueda estar asociado a los reactivos, consulte la Biblioteca de hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet Library) en www.hologic.com/sds.

Los reactivos utilizados en TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII aislado de un cultivo se suministran en tres kits distintos:

KIT SONDA PARA MYCOBACTERIUM KANSASII ACCUPROBE

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

KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS ACCUPROBE

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

KIT DE REACTIVOS DE DETECCIÓN HOLOGIC

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

PRECAUCIONES DE UTILIZACIÓN

- A. Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- B. Observar las precauciones habituales durante la realización de este test (6).

- C. Utilizar exclusivamente para la identificación de *M. kansasii* 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 canalizaciones, 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 deben utilizarse en un plazo de dos meses, dentro del límite de la fecha de caducidad.

Los otros reactivos del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII 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 PREPARACION DE LA MUESTRA

El TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII aislado de un cultivo ha sido diseñado para la identificación de *M. kansasii* aislado a partir de un cultivo.

- A. **Identificación a partir de cultivo en medio sólido.** El test puede ser realizado con colonias obtenidas de un medio sólido apropiado, como Löwenstein-Jensen, o medios de Middlebrook 7H10 ó 7H11, cuando se observe una morfología que evoque *M. kansasii*. 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, 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 manipulador 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 cultivos de caldo Middlebrook 7H9 que posean una opacidad superior o igual a 1 McFarland.

Tomar con pipeta una muestra de 100 µl de la suspensión de caldo perfectamente homogeneizada y distribuirla en el tubo de lisis siguiendo las instrucciones del párrafo PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

MATERIAL SUMINISTRADO

TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII
aislado de un cultivo (*bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855*)

20 Tests	
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 ser adaptados a tubos de 12 x 75 mm. Se recomienda el empleo de bloque calefactor Hologic.

MATERIAL SUPLEMENTARIO DISPONIBLE EN SU DISTRIBUIDOR HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminómetro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i
Sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104
KIT DE REACTIVOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS ACCUPROBE (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800
KIT DE REACTIVOS DE DETECCIÓN HOLOGIC (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791

	Cat. No.
Bloque calefactor (60° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	
Bloque calefactor (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	
Bloque calefactor Twin (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	
Portatubos para el sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027

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 ser 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° ± 1°C y otro bloque calefactor o baño maría 95° ± 5°C.
4. Preparar el luminómetro Hologic. 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 según la reglamentación vigente. Se puede utilizar un cultivo de *Mycobacterium kansasii* (por ejemplo: American Type Culture Collection, ATCC 12478) como control positivo, y un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* (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 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 procedentes del medio sólido o 100 µl del caldo de cultivo correctamente homogeneizado en todos los tubos de lisis, siguiendo las instrucciones proporcionadas en el párrafo OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Si el test se realiza en un cultivo en medio sólido, agitar con el asa la solución 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 desecante.**
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 8 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, enjuagarlos 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 como mínimo 15 minutos, pero no más de 20 minutos. Durante la etapa de SELECCIÓN, incubar los tubos de Reactivo Sonda durante por lo menos 8 minutos, pero no más de 9 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 Luminómetro Leader o a 300 PLU (Photometric Light Units) en el Luminómetro AccuLDR (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. kansasii*, ATCC 12478), inferiores a 30.000 RLU en el Luminómetro Leader o a 900 PLU en el Luminómetro AccuLDR (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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII 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. kansasii*, ATCC 12478) deben satisfacer los siguientes valores:

	AccuLDR (antiguo PAL)	Leader
Control negativo	<300 PLU	<10.000 RLU
Control positivo	>900 PLU	>30.000 RLU

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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII AISLADO DE UN CULTIVO deben ser interpretados en función de los otros datos del laboratorio y correlacionados con los datos clínicos.

VALORES ESPERADOS

EL TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII AISLADO DE UN CULTIVO ha sido comparado a métodos clásicos de cultivo con identificación bioquímica en cinco sitios diferentes analizando un total de 535 cepas. Se han analizado: 353 cepas de *M. kansasii* y 182 cepas de 50 otras especies de micobacterias. Los métodos clásicos de identificación reposan en el estudio de la morfología de las células y de las colonias (características fotocromógenas), en el examen microscópico, un análisis de HPLC (high pressure liquid chromatography) y en una serie de reacciones bioquímicas.

Las cepas han sido determinadas como positivas (> a 30.000 RLU), o como negativas (< a 30.000 RLU) mediante el test AccuProbe. Las observaciones han mostrado que los cultivos negativos tenían un valor comprendido entre 1.156 y 26.655 RLU y los cultivos positivos entre 1.615 y 1.181.622 RLU. La comparación de estos resultados con los métodos clásicos de identificación figura a continuación:

AccuProbe / CULTIVO						
AccuProbe	Pos	Pos	Neg	Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Tasa de Concordancia
Cultivo	Pos	Neg	Pos	Neg		

AccuProbe / CULTIVO						
AccuProbe Cultivo	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidad/ Especificidad	Tasa de Concordancia
Sitio 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Sitio 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Sitio 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Sitio 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98,0%
Sitio 5	32	0	2	0	94,1%/NA	94,1%
Total	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

Seis muestras AccuProbe positivo, cultivo negativo aisladas en 3 Sitios fueron remitidas al Center for Disease Control and Prevention para realizar un análisis de HPLC . Las 6 muestras fueron originalmente identificadas como *M. gastri*, pero tras realizar el análisis por HPLC fueron re-identificadas como *M. kansasii*. La sensibilidad y especificidad de estos 3 sitios es del 97% y 100% respectivamente. La sensibilidad y la especificidad media del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII AISLADO DE UN CULTIVO son entonces respectivamente del 98,0%,100%, con una tasa de concordancia del 98,7%.

RENDIMIENTOS DEL TEST

A. PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

La precisión intra-ensayo del TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII AISLADO DE UN CULTIVO ha sido calculada analizando dos concentraciones diferentes de RNA ribosómico provenientes de *M. kansasii* 10 veces en una misma serie.

Muestra	A	B
Número de ensayos	10	10
Respuesta media (RLU)	55.496	103.798
Desviación tipo	3.542	3.829
Coefficiente de variación	6,4%	3,7%

B. PRECISIÓN INTER-ENSAYO

La precisión inter-ensayo ha sido calculada analizando en simple dos concentraciones de RNA ribosómico provenientes de *M. kansasii*, durante 12 series distintas.

Muestra	A	B
Número de ensayos	12	12
Respuesta media (RLU)	58.001	110.715
Desviación tipo	3.698	6.825
Coefficiente de variación	6,4%	5,8%

C. ESPECIFICIDAD

Un total de 148 cepas ATCC fueron estudiadas mediante el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII aislado de un cultivo. Estas cepas representaban un total de 136 especies procedentes de 44 géneros microbianos diferentes. Se analizó un conjunto filogenético de 11 cepas del complejo *M. kansasii*, 64 cepas de 62 otras especies de micobacterias y 78 cepas procedentes de 43 otros géneros. Sólo las cepas de *M. kansasii* dieron un resultado positivo con el TEST ACCUPROBE DE IDENTIFICACIÓN DE MYCOBACTERIUM KANSASII aislado de un cultivo. Todos los otros microorganismos dieron un resultado negativo.

D. TEST DE SOBRECARGA

Se analizaron diluciones de RNA ribosómico de *M. kansasii*, cuyas concentraciones estaban comprendidas entre 1×10^{-4} µg y 5×10^{-1} µg mediante el test, en presencia de 30 millones de microorganismos pertenecientes a las siguientes especies no diana: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Nocardia asteroides*. No se observó ninguna interferencia ni reacción cruzada.

HOLOGIC®

AccuProbe®

TEST DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLATO DA UNA CULTURA

(bioMérieux cod. 39003 / Hologic Cat. N. 102855)

IMPIEGO

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura è un test che impiega una sonda a DNA per la rapida identificazione del *Mycobacterium kansasii* isolato a partire da una coltura. Questo test impiega la tecnica di ibridazione degli acidi nucleici.

INTRODUZIONE

Il *Mycobacterium Kansasii* (*M. kansasii*) è un batterio fotocromogeno a crescita lenta. Nell'uomo è responsabile di un'affezione polmonare cronica simile alla tubercolosi (1). La diffusione delle infezioni correlate ai micobatteri atipici (non tubercolari) come il *M. kansasii* rappresenta un vero e proprio problema di salute pubblica connesso allo sviluppo dell'epidemia dell'AIDS (2). Negli Stati Uniti, nel 1980, il *M. kansasii* rappresentava il 3,5% dei ceppi patogeni segnalati ai CDC - Centers for Disease Control - (3).

Il serbatoio naturale del *M. kansasii* è sconosciuto. Sono stati effettuati in modo capillare prelievi ambientali nei quali non è stato isolato il *M. kansasii*, al contrario, ne sono stati isolati alcuni ceppi nell'acqua (1).

Le metodiche tradizionali di identificazione dei micobatteri si basano sull'evidenziazione di bacilli alcool-acido resistenti mediante colorazione di Ziehl-Nielsen, seguita dalla messa in coltura, dallo studio della morfologia delle colonie e delle cellule, dal tempo di sviluppo in coltura e dall'analisi biochimica. Il *M. kansasii* è un bacillo a forma di bastoncino più o meno allungato, alcool-acido resistente. Le colonie presentano un aspetto variabile: piatto o bombato, dai contorni irregolari e dalla superficie liscia o rugosa. Le colonie di *M. kansasii* non hanno alcuna pigmentazione quando il loro accrescimento avviene in assenza di luce; assumono, invece, una colorazione gialla se esposte alla luce (fotocromogenicità). L'esposizione prolungata alla luce può comportare la produzione di cristalli di β -carotene rosso scuro sulla superficie e all'interno delle colonie. A livello biochimico il *M. kansasii* riduce i nitrati, idrolizza il tween e l'urea e reagisce positivamente al test della catalasi. L'impiego di queste metodiche tradizionali può richiedere fino a due mesi per identificare un ceppo di micobatterio (1, 4).

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII consente un'identificazione rapida, precisa ed obiettiva del *M. kansasii* isolato a partire da una coltura. Le colonie possono essere evidenziate non appena è visibile la crescita. Per l'identificazione occorre meno di un'ora.

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

(5). Il metodo AccuProbe impiega una sonda a DNA - a catena singola - associata ad una sonda chemiluminescente complementare all'rRNA ribosomiale (rRNA) dell'organismo bersaglio. Una volta liberato l'rRNA dell'organismo bersaglio, la sonda si combina con le sue sequenze omologhe per formare un complesso DNA-RNA stabile. Il Reagente di Selezione consente di differenziare le sonde ibridate da quelle non ibridate. Il luminometro Hologic permette di misurare il segnale luminoso emesso dagli ibridi DNA-RNA. Il risultato é positivo se il luminometro indica un valore superiore o uguale al valore soglia; negativo se mostra un valore inferiore.

REAGENTI

Nota: per informazioni sulle indicazioni di pericolo e i consigli di prudenza che possono essere associati ai reagenti, consultare la libreria delle schede di sicurezza (Safety Data Sheet Library) all'indirizzo www.hologic.com/sds.

I reagenti impiegati nel TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura sono forniti in tre diversi kit:

KIT SONDA PER IL MYCOBACTERIUM KANSASII ACCUPROBE

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

KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURA ACCUPROBE

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

KIT DI REAGENTI DI RIVELAZIONE HOLOGIC

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

PRECAUZIONI D'USO

A. Il test è riservato esclusivamente ad un uso diagnostico *in vitro*.

- B. Durante la realizzazione di questo test adottare le normali precauzioni (6).
- C. Da usarsi esclusivamente per l'identificazione del *M. kansasii* isolato a partire da una coltura.
- D. Impiegare unicamente il materiale compreso nel kit o materiale monouso.
- E. La manipolazione delle colture e tutte le tappe del processo fino alla fase di inattivazione mediante calore devono essere effettuate in un ambiente dotato di livello di sicurezza microbiologica di classe II.
- F. I reagenti di questo kit contengono sodio azide, una sostanza che può reagire con il piombo o il rame delle condutture e formare composti metallici esplosivi. Durante l'eliminazione di questi reagenti, ricordarsi di utilizzare sempre acqua in abbondanza per evitare la formazione di tali composti nelle tubature.
- G. Evitare qualsiasi contatto della cute e delle mucose con i Reagenti di Rilevazione I e II. In caso di contatto, sciacquare accuratamente con acqua le parti interessate. Se si verificassero versamenti di reagenti, diluirli con acqua prima di asciugare la superficie.

CONSERVAZIONE

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

Gli altri reagenti del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura possono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2° e 25°C e rimangono stabili fino alla data di scadenza.

NON CONGELARE I REAGENTI.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura è stato progettato e sviluppato per identificare il *M. kansasii* isolato a partire da una coltura.

- A. **Identificazione a partire da coltura solida.** Il test può essere condotto su terreni solidi adeguati, come un terreno di coltura agar di Löwenstein-Jensen o terreni di coltura di Middlebrook 7H10 o 7H11, quando si osserva una morfologia sospetta per il *M. kansasii*. Il campione può essere testato sin da quando è visibile la proliferazione e durante i successivi sessanta giorni di incubazione.
 1. Il campione di coltura può essere prelevato mediante un'ansa di plastica monouso da 1 µl, un'ansa metallica ovvero un ago in plastica monouso. Data la bassa quantità di liquido in cui i micobatteri verranno rimessi in sospensione si consiglia di non usare tamponi.
 2. Non effettuare prelievi dal mezzo di coltura con i micobatteri.

3. A questo punto la persona addetta può decidere di inoculare un altro mezzo di coltura per confermare la purezza del campione isolato.

B. **Identificazione su brodo di coltura.** Il test può essere condotto in brodo di Middlebrook 7H9 con una torbidità superiore o uguale a 1 McFarland.

Prelevare con la pipetta un campione da 100 µl della sospensione del brodo perfettamente omogeneizzato e dispensarlo nella Provetta di Lisi seguendo le istruzioni del paragrafo PREPARAZIONE DEL CAMPIONE.

MATERIALE COMPRESO NEL KIT

TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura.

bioMérieux cod. 39003 / Hologic Cat. N. 102855

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

MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

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

Ceppi di controllo delle colture

Bagnomaria o incubatore (60° ± 1°C)*

Bagnomaria o incubatore (95° ± 5°C)*

Micropipette (100 µl, 300 µl)

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

Vortex

Nefelometro Standard 1 McFarland

*Gli alloggiamenti all'interno dell'incubatore devono essere perfettamente dimensionati per provette da 12 X 75 mm. Si raccomanda l'uso di incubatori Hologic.

ULTERIORE MATERIALE DISPONIBILE PRESSO IL VOSTRO DISTRIBUTORE HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminometro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux cod. 39400</i>)	103100i
Sonicator Hologic (<i>bioMérieux cod. 39409</i>)	901104
KIT DI REAGENTI DI IDENTIFICAZIONE DI COLTURE ACCUPROBE (<i>bioMérieux cod. 39305</i>)	102800
KIT DI REAGENTI DI RILEVAZIONE HOLOGIC (<i>bioMérieux cod. 39300</i>)	201791

	Cat. No.
Incubatore (60° ± 1°C) (<i>bioMérieux cod. 39406</i>)	
Incubatore (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux cod. 39407</i>)	
Incubatore Twin (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux cod. 39408</i>)	
Portaprovette per il sonicatore Hologic (<i>bioMérieux cod. 39313</i>)	104027

PROCEDIMENTO

A. PREPARAZIONE DEL MATERIALE

1. Riempire il serbatoio del sonicatore con acqua calda fino a circa 1 cm dal bordo.
2. L'acqua del bagno ad ultrasuoni deve essere perfettamente degassificata prima della manipolazione per ottimizzare il trasferimento energetico degli ultrasuoni. Per degassificare completamente l'acqua far funzionare il degassificatore per 15 minuti.
3. Impostare un incubatore o un sistema a bagnomaria a 60° ± 1°C e un altro incubatore o sistema a bagnomaria a 95° ± 5°C.
4. Preparare il luminometro Hologic. Assicurarsi che la quantità di Reagenti di Rivelazione I e II sia sufficiente per effettuare i test.

B. CONTROLLI

In ogni laboratorio occorre testare sistematicamente ceppi come controllo positivo e negativo, secondo le normative in vigore. È possibile usare una coltura di *Mycobacterium kansasii* (ad es. American Type Culture Collection, ATCC 12478) come controllo positivo e una coltura di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177) come controllo negativo.

C. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

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

4. Richiudere le Provette di Lisi e agitarle con un vortex brevemente.

D. LISI DEL CAMPIONE

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

E. IBRIDAZIONE

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

F. SELEZIONE

1. Prelevare le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore. Rimuovere e conservare i tappi. Dispensare 300 μl di Reagente 3 (Reagente di Selezione) in ogni provetta. Richiudere le provette e agitare con un Vortex per rendere omogenea la miscela.
2. Mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione per 8 minuti a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a bagnomaria o in incubatore.
3. Rimuovere le provette di Reagente Sonda dal bagnomaria o dall'incubatore e mantenerle a temperatura ambiente almeno per 5 minuti. Togliere e buttare i tappi. **Avvalendosi di un luminometro leggere i risultati del test nell'ora successiva.**

G. LETTURA

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

OSSERVAZIONI

- A. REAGENTI: il Reagente 2 (Tampone di Ibridazione) può precipitare. Riscaldarlo a 35° - 60°C e agitarlo con un Vortex per sciogliere il precipitato.
- B. TEMPERATURA: l'ibridazione e la selezione sono reazioni temperatura-dipendenti. Di conseguenza, è indispensabile mantenere il bagnomaria o l'incubatore alla temperatura raccomandata.
- C. DURATA DELLE OPERAZIONI: le reazioni di ibridazione e di selezione dipendono dal tempo. L'ibridazione deve durare come minimo 15 minuti e come massimo 20 minuti. Durante la SELEZIONE, mettere le provette di Reagente Sonda in incubazione almeno per 8 minuti senza superare però il limite dei 9 minuti.
- D. BAGNOMARIA: il livello d'acqua deve essere sufficientemente alto per far sì che le provette di lisi siano immerse fino all'anello di chiusura, ma non oltre. Assicurarsi inoltre che la totalità del liquido di reazione delle provette di Reagente Sonda sia completamente immerso.
- E. USO DEL VORTEX: è fondamentale disporre di una miscela omogenea durante la PREPARAZIONE del CAMPIONE e la SELEZIONE, in modo particolare dopo l'inoculazione dei microrganismi ai Reagenti 1 e 2 e dopo l'aggiunta del Reagente 3.
- F. SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMI
 - 1. Alti valori di controllo negativo (*M. tuberculosis*, ATCC 25177), superiori a 10.000 RLU (Relative Light Units) sul Luminometro Leader o a 300 PLU (Photometric Light Units) sul Luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere riscontrati quando l'omogeneizzazione è stata insufficiente dopo l'inoculazione del Reagente 3 (Reagente di Selezione) o quando siamo in presenza di vari tipi di colonie. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.
 - 2. Bassi valori di controllo positivo (*M. kansasii*, ATCC 12478) inferiori a 30.000 RLU sul Luminometro Leader o a 900 PLU sul Luminometro AccuLDR (precedentemente PAL) possono essere rilevati quando il numero di germi è insufficiente, quando la sonicazione non è stata correttamente eseguita o quando il test viene effettuato su colture miste od invecchiate. Per verificare che si tratti di una coltura mista è possibile trapiantarne una parte su un adeguato terreno di coltura agar e metterla ad incubare.

RISULTATI DEL TEST

A. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

	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 E ACCETTABILITÀ DEI RISULTATI

I controlli negativi (ad es. *M. tuberculosis*, ATCC 25177) e positivi (ad es. *M. kansasii*, ATCC 12478) devono soddisfare i seguenti valori:

	AccuLDR (precedentemente PAL)	Leader
Controllo negativo	<300 PLU	<10.000 RLU
Controllo positivo	>900 PLU	>30.000 RLU

LIMITI DEL TEST

Questo metodo è stato basato su colture fresche realizzate in terreni di coltura solidi e sui tipi di brodo di coltura menzionati nel paragrafo PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE. Le performance di questo test eseguito direttamente sui campioni clinici (urinari, coprologici o respiratori) non sono state valutate.

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

VALORI ATTESI

Il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLATO DA UNA COLTURA è stato confrontato con le metodiche tradizionali di identificazione biochimica presso cinque centri. Sono stati analizzati in totale 535 stock-colture. Sono stati testati: 353 stock-colture di *M. kansasii* e 182 stock-colture di altre 50 specie di micobatteri. Le metodiche tradizionali di identificazione comprendevano l'analisi della morfologia delle cellule e delle colonie (caratteristiche fotocromogene), l'esame microscopico, l'HPLC (high pressure liquid chromatography) e una serie di test biochimici. Il test AccuProbe ha permesso di classificare le colture positive (> 30.000 RLU) e negative (< 30.000 RLU). Le colture negative hanno evidenziato risultati compresi fra 1156 e 26.655 RLU mentre le colture positive hanno mostrato risultati compresi fra 1.615 e 1.181.622 RLU. Il raffronto di questi risultati con le metodiche tradizionali di identificazione è di seguito indicato.

AccuProbe / COLTURA

AccuProbe Coltura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilità/ Specificità	Tasso di Concordanza
Centro 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Centro 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Centro 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Centro 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98,0%
Centro 5	32	0	2	0	94,1%/NA	94,1%
Total	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

Sei AccuProbe positivi, coltura negativi esaminati presso il Centro 3, sono stati inviati al Center for Disease Control and Prevention affinché venisse eseguita l'HPLC.

Tutte e sei le colture erano state identificate originariamente come *M. gastris*, ma una volta sottoposte ad HPLC sono risultate *M. kansasii*. La sensibilità e la specificità presso il Centro 3 sono rispettivamente 97,1 % e 100%.

La sensibilità e la specificità media sono rispettivamente 98,0% e 100%, con un tasso di concordanza del 98,7%.

PERFORMANCE DEL TEST

A. PRECISIONE INTRA-TEST

La precisione intra-test del TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII isolato da una coltura è stata calcolata analizzando due diverse concentrazioni di RNA ribosomiale di *M. kansasii* per 10 volte in una medesima serie.

Campione	A	B
Numero di test	10	10
Risposta media (RLU)	55.496	103.798
Deviazione standard	3.542	3.829
Coefficiente di variazione	6,4%	3,7%

B. PRECISIONE INTRA-TEST

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

Campione	A	B
----------	---	---

Numero di test	12	12
Risposta media (RLU)	58.001	110.715
Deviazione standard	3.698	6.825
Coefficiente di variazione	6,4%	5,8%

C. SPECIFICITÀ

È stato studiato un totale di 148 colture con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DI MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLATO DA UNA COLTURA. Questi ceppi comprendevano 136 specie provenienti da 44 generi diversi. È stato testato un pannello filogenetico di 11 ceppi di *M. kansasii*, 64 ceppi di altre 62 specie di micobatteri e 78 ceppi provenienti da altri 43 generi. Solo i ceppi di *M. kansasii* hanno presentato un risultato positivo con il TEST ACCUPROBE DI IDENTIFICAZIONE DEL MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLATO DA UNA COLTURA. Tutti gli altri microrganismi hanno evidenziato un risultato negativo.

D. TEST DI SOVRACCARICO

Diluizioni di RNA ribosomiale di *M. kansasii* le cui concentrazioni erano comprese fra 1×10^{-4} µg e 5×10^{-1} µg per test sono state analizzate in presenza di 30 milioni di microrganismi appartenenti a una delle seguenti specie non bersaglio: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia asteroides*. Non è stata rilevata alcuna interferenza né reazione incrociata.

HOLOGIC®

AccuProbe®

TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII ISOLADO DE UMA CULTURA

(bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855)

UTILIZAÇÃO

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura é um teste de identificação rápida por sonda ADN de *Mycobacterium kansasii* isolado a partir de uma cultura. Este teste utiliza a técnica de hibridização de ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

Mycobacterium kansasii (*M. kansasii*) é uma bactéria fotocromogénica de crescimento lento, responsável no homem por uma doença pulmonar crónica semelhante à tuberculose (1). A propagação das infecções ligadas às micobactérias atípicas (não tuberculosas) tais como *M. kansasii* é um verdadeiro problema de saúde pública directamente ligado ao desenvolvimento da epidemia da SIDA (2). Nos Estados-Unidos, em 1980, o *M. kansasii* representava 3,5% das estirpes patogénicas assinaladas nos Centers for Disease Control (3).

O reservatório natural de *M. kansasii* é desconhecido. Extensas amostras de solo foram analisadas sem sucesso, enquanto que algumas estirpes foram isoladas da água (1).

Os métodos clássicos de identificação das micobactérias baseiam-se na detecção dos bacilos ácido-álcool-resistentes por coloração de Ziehl-Nielsen, seguida de cultura, estudo da morfologia das colónias e das células, medição da taxa de crescimento, e análise bioquímica. O *M. kansasii* é um bacilo ácido-álcool-resistente em forma de bastonete mais ou menos longo. As colónias têm um aspecto variável: planas ou convexas, com contornos irregulares e uma superfície lisa ou rugosa. As colónias de *M. kansasii* não têm nenhuma pigmentação quando crescem no escuro e ficam com uma cor amarelo-limão quando expostas à luz (fotocromogenicidade). A exposição prolongada à luz pode provocar a produção de cristais de β -caroteno vermelho escuro, na superfície e no interior das colónias. No plano bioquímico, o *M. kansasii* reduz os nitratos, hidroliza o tween e a ureia e reage positivamente ao teste da catalase. Podem ser necessários dois meses para identificar uma estirpe utilizando os métodos tradicionais (1, 4).

O TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII permite uma identificação rápida, precisa e objectiva de *M. kansasii* isolado a partir de uma cultura. As colónias podem ser identificadas logo que a proliferação seja visível. A identificação faz-se em menos de uma hora.

PRINCÍPIO

Os testes por hibridização de ácidos nucleicos baseiam-se na capacidade de cadeias complementares de ácidos nucleicos emparelharem de forma específica para formar complexos bicatenários estáveis (5).

O método AccuProbe utiliza uma sonda ADN monocatenária conjugada com um marcador quimioluminescente complementar do 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 Hologic 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

Nota: Para obter informações sobre quaisquer declarações de perigo e de precaução que possam estar associadas a estes reagentes, consulte a Biblioteca de fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet Library) em www.hologic.com/sds.

Os reagentes utilizados para o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura são fornecidos em três kits distintos:

KIT SONDA PARA MYCOBACTERIUM KANSASII ACCUPROBE

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

KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURA ACCUPROBE

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

KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO HOLOGIC

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

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Unicamente para diagnóstico *in vitro*.
- Usar as precauções habituais quando efectuar este teste (6).
- Utilizar unicamente para a identificação de *M. kansasii* isolado 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

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

Os outros reagentes do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado 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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura foi concebido para a identificação de *M. kansasii* 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 *M. kansasii*. 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 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 em culturas de 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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII Isolado de Uma Cultura

(*bioMérieux ref. 39003 / Hologic Cat. No. 102855*)

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 Hologic.

MATERIAL SUPLEMENTAR DISPONÍVEL NO SEU DISTRIBUIDOR HOLOGIC:

	Cat. No.
Luminómetro Hologic Leader 50i (<i>bioMérieux ref. 39400</i>)	103100i
Sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39409</i>)	901104
KIT DE REAGENTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS ACCUPROBE (<i>bioMérieux ref. 39305</i>)	102800
KIT DE REAGENTES DE DETECÇÃO HOLOGIC (<i>bioMérieux ref. 39300</i>)	201791
Bloco de aquecimento (60° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39406</i>)	
Bloco de aquecimento (95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39407</i>)	

	Cat. No.
Bloco de aquecimento Twin (60°/95° ± 1°C) (<i>bioMérieux ref. 39408</i>)	
Suporte de tubos para o sonicador Hologic (<i>bioMérieux ref. 39313</i>)	104027

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 Hologic. 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 *Mycobacterium kansasii* (por ex. American Type Culture Collection, ATCC 12478) como controlo positivo, e uma cultura de *Mycobacterium tuberculosis* (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, seguindo as instruções descritas no parágrafo COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA. Se o teste for efectuado com uma cultura em meio sólido, agitar a ansa ou agulha na solução para colocar as células em suspensão.
4. Fechar os Tubos de Lise e agitá-los rapidamente num Vortex.

D. LISE DA AMOSTRA

1. Inserir os Tubos de Lise no suporte do sonicador de forma a que a mistura de reagente no fundo dos tubos fique imersa, mantendo as tampas fora de água. Colocar o suporte 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 8 minutos a $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em banho-maria ou bloco de aquecimento.
3. Retirar os tubos de Reagente Sonda do banho-maria ou do bloco de aquecimento e deixá-los à temperatura ambiente durante, pelo menos, 5 minutos. Retirar e eliminar as tampas. **Ler os resultados no luminómetro durante a hora seguinte.**

G. DETECÇÃO

1. Seleccionar o protocolo apropriado no luminómetro.
2. Para retirar resíduos da superfície dos tubos, limpá-los com papel absorvente húmido. Em seguida, colocá-los no luminómetro 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° - 60°C e agité-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, 8 minutos, mas não mais de 9 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 Luminómetro Leader ou a 300 PLU (Photometric Light Units) no Luminómetro 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. kansasii*, ATCC 12478), inferiores a 30.000 RLU no Luminómetro Leader ou a 900 PLU no Luminómetro 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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado 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 (por ex. *M. kansasii*, ATCC 12478) 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

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.

Os resultados do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado 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 DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura foi comparado com os métodos clássicos de identificação de cultura em 5 locais diferentes, testando um total de 535 estirpes. Foram testadas 353 estirpes de *M. kansasii* e 182 estirpes de 50 outras espécies de micobactérias. Os métodos clássicos de identificação compreendiam a taxa de crescimento, a morfologia das células e das colónias (características fotocromogénicas), o exame microscópico, HPLC (high pressure Liquid Chromatography) e testes bioquímicos.

As estirpes foram classificadas como positivas (> a 30.000 RLU) ou negativas (< a 30.000 RLU). As culturas negativas deram resultados compreendidos entre 1.156 e 26.655 RLU e as culturas positivas entre 1.615 e 1.181.622 RLU. A comparação destes resultados com os métodos clássicos de identificação, é descrita abaixo:

AccuProbe / CULTURA						
AccuProbe Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	% de Concordância

AccuProbe / CULTURA						
AccuProbe Cultura	Pos Pos	Pos Neg	Neg Pos	Neg Neg	Sensibilidade/ Especificidade	% de Concordância
Local 1	85	0	0	54	100%/100%	100%
Local 2	100	0	0	20	100%/100%	100%
Local 3	27	6	1	6	96,4%/50%	82,5%
Local 4	96	0	4	102	96,0%/100%	98,0%
Local 5	32	0	2	0	94,1%/NA	94,1%
Total	340	6	7	182	98,0%/96,8%	97,6%

Seis estirpes AccuProbe-positivas, estirpes em cultura-negativa do Local 3 foram enviadas para Centros de Controlo de Doença e Prevenção para análise em HPLC. A totalidade das seis estirpes tinha sido originalmente identificada como *M. gastri*, mas a seguir à análise de HPLC foram novamente identificadas como *M. kansasii*. A sensibilidade e a especificidade do Local 3 foram, respectivamente, de 97,1% e 100%. A sensibilidade e a especificidade média do teste são, portanto, respectivamente de 98,0% e 100%, com uma taxa de concordância de 98,7%.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

A. PRECISÃO INTRA-ENSAIO

A precisão intra-ensaio do TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura foi calculada testando duas concentrações diferentes de ARN ribossómico de *M. kansasii*, 10 vezes numa mesma série.

Amostra	A	B
Número de ensaios	10	10
Resposta média (RLU)	55.496	103.798
Desvio-padrão	3.542	3.829
Coeficiente de variação	6,4%	3,7%

B. PRECISÃO INTER-ENSAIO

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

Amostra	A	B
Número de ensaios	12	12
Resposta média (RLU)	58.001	110.715
Desvio-padrão	3.698	6.825
Coeficiente de variação	6,4%	5,8%

C. ESPECIFICIDADE

Foram testadas 148 estirpes de culturas ATCC com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII isolado de uma cultura. Estas estirpes compreendiam 136 espécies de 44 géneros diferentes. Foi analisado um painel filogenético de 11 estirpes de *M. kansasii*, 64 estirpes de 62 outras espécies de micobactérias e 78 estirpes de 43 outros géneros. Unicamente as estirpes de *M. kansasii* deram um resultado positivo com o TESTE ACCUPROBE DE IDENTIFICAÇÃO DE MYCOBACTERIUM KANSASII. Todos os outros microrganismos deram um resultado negativo.

D. TESTE DE SOBRECARGA

Foram testadas diluições de ARN ribossómico de *M. kansasii* cujas concentrações estavam compreendidas entre 1×10^{-4} µg e 5×10^{-1} µg por teste, na presença de 30 milhões de microrganismos pertencentes às espécies não-alvo seguintes: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Nocardia asteroides*. Não foi observada nenhuma interferência nem reacção cruzada.

Bibliography Literatur Bibliographie Bibliografia

1. **Wayne, L.G., and G.P. Kubica.** 1986. The Mycobacteria. p. 1435 - 1457. *In* Sneath, P.H.A, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.). *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
2. **Collins, F.M.** 1989. Mycobacterial disease, Immunosuppression, and Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**:360-377.
3. **Good, R.C. and Snider, D.E. Jr.** 1982. *J. Infect. Dis.* **146**:829-833.
4. **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.
5. **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. (eds.) *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. **Centers for Disease Control.** 1988. *United States Morbid. and Mortal. Weekly Rep.* **37**:377-382, 387-388.



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



Hologic N.V.
Da Vincilaan 5
1930 Zaventem
Belgium

This product may be covered by one or more U.S. patents identified at www.hologic.com/patents.

102897F-01 Rev. 003 2018-03
©1991 - 2018 Hologic, Inc. All rights reserved.