

AccuProbe®

TEST DO IDENTYFIKACJI MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX Z KULTURY BAKTERYJNEJ

TYLKO DO UŻYTKU NA EXPORT
(bioMérieux ref. 39001 / Hologic Cat. No. 102845)

ZASTOSOWANIE

TEST DO IDENTYFIKACJI MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX Z KULTURY BAKTERYJNEJ ACCUPROBE jest szybkim testem zawierającym sondę DNA, który wykorzystuje technikę hybrydizacji kwasów nukleinowych do identyfikacji *Mycobacterium avium* complex (*M. avium* complex) wyizolowanego z kultury bakteryjnej.

OPIS I WYJAŚNIENIE ZASADY TESTU

Zakażenia wywołane przez mykobakterie z grupy *M. avium* complex najczęściej występują u pacjentów z obniżoną odpornością lub chorych na AIDS (7, 15). Obserwuje się wzrost klinicznego znaczenia *M. avium* complex w wywoływaniu przewlekłych chorób płuc (8, 17). Aktualnie, liczne laboratoria informują, że częstotliwość izolacji *M. avium* complex dorównuje lub nawet przewyższa izolację *M. tuberculosis* (17). Leczenie tych zakażeń jest trudne, a niebezpieczna w skutkach infekcja wymaga szybkiej diagnostyki.

M. avium complex należy do mykobakterii wolnorosnących, które mogą w nieznacznym stopniu wytwarzać barwnik lub go nie wytwarzają, nie hydrolizują TWENU 80 ani nie rozkładają mocznika, nie redukują azotanów, wytwarzają mniej niż 45 mm piany w półilościowym teście katalazowym, dają pozytywną reakcję na nikotynamidazę i pyrazynamidazę. Do *M. avium* complex należą dwa gatunki mykobakterii *M. avium* i *M. intracellulare* (19). Fenotypowo te organizmy są nie do odróżnienia, również testami biochemicznymi nie można ich zróżnicować.

Spośród ogólnie stosowanych metod różnicowania izolowanych mykobakterii do grupy *M. avium* complex należy wymienić: hodowlę i testy biochemiczne, serotypowanie, chromatografię gazowo-cieczową, wysokociśnieniową chromatografię cieczową (HPLC) oraz sondy DNA znakowane izotopami, które reagują z rybosomalnym RNA (Hologic Rapid Diagnostic System for the MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX) (1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 16, 18). Ponadto większość szczepów *M. avium* complex może być identyfikowana jako jeden z dwóch *M. avium* lub *M. intracellulare* metodą serotypowania poprzez adsorpcję specyficznych przeciwciał zawartych w surowicy na powierzchni antygenowej komórek. Jednakże, aktualne badania nad T-katalazą, analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, hybrydizacja DNA-DNA pokazują, że niektóre serotypy mimo, że poprzednio były określone jako *M. intracellulare*, obecnie należą do gatunku *M. avium* (1, 14, 21).

Jest to niewielka liczba biochemicznie określonych izolatów *M. avium* complex, które nie mogą być wiarygodnie określone gatunkowo przez którąś z wyżej wymienionych metod jako jeden z dwóch *M. avium* lub *M. intracellulare*. Dokładny taksonomiczny status takich szczepów jest aktualnie niepewny. TEST DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE jest przeznaczony do wykrywania *M. avium*, *M. intracellulare* oraz innych izolatów częściej obecnie identyfikowanych jako przynależne do *M. avium* complex. Nie jest to jednak różnicowanie pomiędzy gatunkami przynależnymi do kompleksu (20, 22, 23). Rzadko izolaty *M. avium* complex nie dają reakcji pozytywnej w tym teście.

ZASADY TESTU

Testy hybrydizacji kwasów nukleinowych są oparte na zdolności specyficznego łączenia się komplementarnej nici kwasu nukleinowego w stabilne dwuniciowe kompleksy (4). System AccuProbe wykorzystuje jednoniciową sondę DNA znakowaną chemiluminescencyjnie, która jest komplementarna do rybosomalnego RNA docelowego organizmu. Po uwolnieniu rybosomalnego RNA z organizmu, znakowana sonda DNA łączy się z docelowym rybosomalnym RNA organizmu w stabilną DNA:RNA hybrydę. Odczynnik do Selekcji pozwala na zróżnicowanie niezhybrydowanej i zhybrydowanej sondy. Znakowane hybrydy DNA:RNA są oznaczane w luminometrze Hologic. Pozytywny wynik jest odczytywany w luminometrze jako równy lub wyższy aniżeli punkt odcięcia. Wartość poniżej tego punktu odcięcia daje wynik negatywny.

ODCZYNNIKI

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

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

ZESTAW ZAWIERAJĄCY SONDĘ MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE

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

ODCZYNNIKI DO IDENTYFIKACJI KULTURY ACCUPROBE

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

ODCZYNNIKI HOLOGIC DO DETEKCJI

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

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Stosować powszechnie używane środki ostrożności w trakcie wykonywania tego testu (2).
- Stosować wyłącznie do identyfikacji *M. avium* complex wyizolowanego z kultury.
- Używać wyłącznie dostarczonych lub specyficznych dla pracy laboratorium wyrobów jednorazowych.
- Przesiewy z hodowli i wszystkie kroki związane z postępowaniem z hodowlą łącznie z inaktywacją przez podgrzewanie powinny być wykonywane w Laboratorium II Klasy Zabezpieczenia Biologicznego.
- Odczynniki w tym teście zawierają azydek sodu, który może się łączyć z ołowiem lub miedzią w potencjalnie wybuchowe związki metalu. Przed usunięciem tych odczynników, zawsze należy rozcieńczyć materiał dużą ilością wody aby zapobiec niepożądanym reakcjom.
- Unikać kontaktu Odczynników do Odczytu I i II ze skórą i błonami śluzowymi. Jeżeli doszło do kontaktu skóry z odczynnikami, przemyć to miejsce obficie wodą. Jeżeli odczynniki rozlały się, należy rozcieńczyć je wodą przed wytarciem powierzchni.

PRZECHOWYWANIE TESTU I WYMAGANIA HANDLOWE

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

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

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

TEST DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE jest przeznaczony do identyfikacji *M. avium* complex izolowanego z kultury.

- Hodowla na Podłożu Stałym.** Uzyskany wzrost na podłożach stałych takich jak: skosy Lowensteina-Jensena, Middlebrooka 7H10 lub na płytkach 7H11, wizualnie przypominający *M. avium* complex należy poddać badaniu. Próbkę mogą być badane bezpośrednio po zaobserwowaniu wzrostu oraz podczas następnym sześćdziesięciu dni inkubacji.
 - Wzrost należy zebrać 1 µL jednorazową plastikową lub metalową szpatułką albo plastikową igłą. Nie należy używać wymazówek, z uwagi na zbyt małą objętość cieczy, w której znajdują się komórki.

2. Unikać pobrania stałego podłoża razem z komórkami.
3. Osoba prowadząca badanie w tym czasie może wybrać kolonie z innej płytki w celu potwierdzenia czystości izolatu.

B. **Hodowla bulionowa.** Wzrost na podłożu bulionowym Middlebrooka 7H9 o gęstości równej lub większej od 10 Standardu Nefelometrycznego McFarlanda może być badany Testem DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE . Należy pobrać pipetą 100µl próbki z dobrze wymieszanej zawiesiny bulionowej i przenieść do Probówek z Odczynnikami do Lizy, jak opisano poniżej.

DOSTARCZONE MATERIAŁY

ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX CULTURE IDENTIFICATION TEST
bioMérieux ref. 39001 / Hologic Cat. No. 102845 20 testów

Odczynnik Zawierający Sondę (P)	4 x 5 probówek
Probówki do Lizy (LT)	1 x 20 probówek

MATERIAŁY WYMAGANE LECZ NIE DOSTARCZONE W ZESTAWIE

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

Szczepy do Kontroli Hodowli

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

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

Mikropipety (100 µL, 300 µL)

Repipetor (100 µL, 300 µL)

Mieszadło Vortex

McFarland 1^o standard nefelometryczny

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

PRODUKTY DOSTĘPNE U DYSTRYBUTORA HOLOGIC

Luminometr Hologic Leader 50i

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

Sonikator Hologic

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

ACCUPROBE CULTURE IDENTIFICATION REAGENT KIT

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

HOLOGIC DETECTION REAGENT KIT

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

Sucha łaźnia (60° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39406)

Sucha łaźnia (95° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39407)

Sucha łaźnia podwójna (60°/95° ± 1°C)

(bioMérieux ref. 39408)

Statyw do Sonikatora Hologic

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

WYKONANIE TESTU

A. PRZYGOTOWANIE SPRZĘTU

1. W celu swobodnego przepływu ultradźwięków, woda musi być dokładnie odgazowana zgodnie z następującym postępowaniem:
 - a. Napełnić sonikator gorącą wodą, tak aby do górnej krawędzi pozostało ½ cala /około 1,20 cm/
 - b. Uruchomić sonikator na 15 min. w celu dokładnego odgazowania wody.
2. Dostosować jeden blok grzejny lub łaźnię wodną do temp. 60° ± 1°C i następny blok grzejny lub łaźnię wodną do temp. 95° ± 5°C.
3. Przygotować luminometr Hologic Leader do pracy. Upewnić się, że jest wystarczająca ilość Odczynników do Odczytu I i II do wykonania testu.

B. SZCZEPY KONTROLNE

Szczepy używane do kontroli pozytywnej i negatywnej powinny być zbadane rutynowo w każdym laboratorium zgodnie z miejscowymi przepisami. Hodowla *Mycobacterium avium* (np., American Type Culture Collection, ATCC #25291) lub *Mycobacterium intracellulare* (np., ATCC #13950) mogą być używane jako kontrola pozytywna, natomiast hodowla *Mycobacterium tuberculosis* (np., ATCC #25177) może być używana jako kontrola negatywna.

C. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

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

D. LIZA PRÓBEK

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

E. HYBRYDYZACJA

1. Otworzyć foliową saszetkę przecinając ją równolegle do górnej krawędzi. Wyjąć odpowiednią liczbę Probówek z Sondą (Probe Reagent Tubes) do zbadania izolatów z hodowli i/lub kontroli. Zamknąć ponownie saszetkę przez zagięcie kilkakrotne otwartej krawędzi saszetki i zabezpieczyć taśmą samoprzylepną lub klipsem. Pozostawić torebkę z substancją osuszającą wewnątrz saszetki.
2. Ponumerować odpowiednią liczbę Probówek z Odczynnikiem zawierającym Sondę przeznaczonych do zbadania izolatów z hodowli i/lub kontroli. Zdjąć i zachować koreczki.
3. Odpipetować 100 µL zlizowanych próbek z Probówek z Odczynnikiem Lizującym do odpowiednich Probówek z Odczynnikiem zawierającym Sondę.
4. Zamknąć Probówki z Odczynnikiem z Sondą i inkubować przez 15 minut w temp. $60^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ w łaźni wodnej lub bloku grzejnym.

F. SELEKCJA

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

G. ODCZYTYWANIE WYNIKÓW

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

UWAGI PRAKTYCZNE

- A. ODCZYNNIKI: Odczynnik 2 (Hybridization Buffer) może się wytrącić. Podgrzewanie i mieszanie roztworu w temp. od 35°C do 60°C pozwoli na rozpuszczenia precipitatu.
- B. TEMPERATURA: Reakcja Hybrydyzacji i Selekcji są zależne od temperatury. Dlatego konieczne jest aby temperatura łaźni wodnej lub bloku grzejnego była utrzymywana w odpowiednim zakresie.
- C. CZAS: Reakcja Hybrydyzacji i Selekcji są zależne od czasu. Hybrydyzacja trwa co najmniej 15 minut ale nie dłużej niż 20 minut. Inkubacja Probówek z Odczynnikiem zawierającym Sondę podczas SELEKCJI trwa co najmniej 5 minut ale nie dłużej niż 6 minut.
- D. ŁAŻNIA WODNA: Poziom wody w łaźni wodnej powinien być utrzymywany, tak aby zapewnić zanurzenie Probówek z Odczynnikami Lizującymi (Lysing reagent Tubes), jednak nie powinien sięgać powyżej zaznaczonego poziomu. Należy również zapewnić całkowite zanurzenie w wodzie płynnej części reakcyjnej Probówek z Odczynnikami zawierającymi Sondę.
- E. WYTRZAŚANIE: Bardzo istotnym elementem jest uzyskanie homogennej mieszaniny podczas PRZYGOTOWYWANIA PRÓBEK oraz podczas etapów SELEKCJI, zwłaszcza po dodaniu komórek do Odczynnika 1 i 2 oraz po dodaniu Odczynnika 3.
- F. ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW
 1. Podwyższone wartości kontroli negatywnej (*M. tuberculosis* ATCC #25177) powyżej 10,000 RLU (Względne jednostki światła) w LUMINOMETRZE Leader lub 300 PLU (Fotometryczne jednostki światła) w aparacie AccuLDR (poprzednio PAL) mogą być spowodowane niewystarczającym wymieszaniem próbki po dodaniu Odczynnika 3 (Odczynnik do Selekcji) lub na skutek badania mieszanych hodowli. Ze względu na możliwość występowania mieszanych hodowli, część wzrostu należy przesiać na odpowiednie podłoże agarowe i inkubować w celu sprawdzenia namnożonych typów kolonii.
 2. Niskie wartości kontroli pozytywnej (*M. avium* ATCC #25291 lub *Mycobacterium intracellulare* ATCC #13950) niższe od 30,000 RLU w LUMINOMETRZE Leader lub 900 PLU w AccuLDR (poprzednio PAL) mogą być spowodowane niewystarczającą liczbą komórek, niewłaściwą sonikacją lub badaniem mieszanych albo starych hodowli. Ze względu na możliwość występowania mieszanych hodowli, część wzrostu należy przesiać na odpowiednie podłoże agarowe i inkubować w celu sprawdzenia namnożonych typów kolonii.

WYNIKI

A. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki TESTU ACCUPROBE DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX

opierają się na następujących wartościach punktów odcięcia /cut-off/. Próbki emitujące sygnały wyższe lub równe tym wartościom, są uznawane jako dodatnie. Próbki emitujące sygnały niższe aniżeli wartość tego punktu odcięcia /cut-off/ są uznawane jako ujemne. Wyniki w powtarzających się zakresach powinny być powtórzone. Jeżeli w powtórnym badaniu wystąpi podejrzany wynik, wówczas ta hodowla powinna być przesiana w celu sprawdzenia jej czystości.

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

B. KONTROLA JAKOŚCI I AKCEPTOWANIE WYNIKÓW

Kontrola ujemna (np., *M. tuberculosis*, ATCC #25177) i kontrola dodatnia (np., *M. avium*, ATCC #25291), zarówno z bulionu jak i ze stałego podłoża powinny wykazywać następujące wartości:

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

Jeżeli wartości kontroli dodatniej lub ujemnej nie wykazują wymaganego zakresu, wyniki testu nie mogą być wydane.

OGRANICZENIA

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

Test ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX DO IDENTYFIKACJI KULTURY nie posiada zdolności różnicowania gatunków w obrębie *M. avium* complex. Izolaty którekolwiek z gatunków będą identyfikowane jako *M. avium* complex.

Jest mała liczba biochemicznie określonych izolatów *M. avium* complex, których nie da się zróżnicować metodami serologicznymi lub metodą HPLC na *M. avium* lub *M. intracellulare*. Niektóre z tych szczepów również nie mogą być wykryte Testem ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX DO IDENTYFIKACJI KULTURY. Dokładny taksonomiczny status tych szczepów do chwili obecnej jest niepewny. Test ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX DO IDENTYFIKACJI KULTURY identyfikuje szczepy *M. avium* complex, które zaklasyfikowano do tego kompleksu w oparciu o tradycyjne metody HPLC lub GLC. Test ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX DO IDENTYFIKACJI KULTURY może wykrywać rzadko występujące szczepy *M. avium* complex, których kliniczne znaczenie nie zostało dobrze udokumentowane.

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

OCZEKIWANE WARTOŚCI

TEST ACCUPROBE MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX DO IDENTYFIKACJI KULTURY był porównywany w trzech ośrodkach do standardowych biochemicznych metod stosowanych do identyfikacji kultury. Ośrodek 1 stanowił korporację Hologic; Ośrodki 2 i 3 były Laboratoriami Referencyjnymi. Zbadano 717 izolatów *M. avium* complex (51 *M. avium*, 42 *M. intracellulare*, i 624 *M. avium* complex) oraz 235 innych szczepów *Mycobacterium* reprezentowanych przez 22 gatunki. Izolaty były zaklasyfikowane jako pozytywne ($\geq 30,000$ RLU) lub negatywne ($< 30,000$ RLU). Zakres wyników dla kultur negatywnych wynosił od 1,353 do 14,675 RLU i od 30,829 do 2,742,691 RLU dla kultur pozytywnych. Porównanie uzyskanych wyników do standardowej metody hodowlanej jest pokazana poniżej.

ACCUPROBE / STANDARDOWE PROCEDURY BIOCHEMICZNE

AccuProbe	Poz	Poz	Neg	Neg	Czułość/ Specyficzność	Procent Zgodności
Hodowla	Poz	Neg	Poz	Neg		
Ośrodek 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Ośrodek 2	146	0	1	102	99.3%/100%	99.6%
Ośrodek 3	526	0	17	74	96.9%/100%	97.2%
Ogółem	716	0	18	223	97.6%/100%	98.1%

Analiza rozbieżności

ACCUPROBE / STANDARDOWE PROCEDURY BIOCHEMICZNE

AccuProbe	Poz	Poz	Neg	Neg	Czułość/ Specyficzność	Procent Zgodności
Hodowla	Poz	Neg	Poz	Neg		
Ośrodek 1	44	0	0	47	100%/100%	100%
Ośrodek 2	146	0	1	102	99.3%/100%	99.6%
Ośrodek 3	526	0	1	86	100%/100%	100%
Ogółem	716	0	2	235	99.9%/100%	99.9%

Jedna rozbieżność dotyczyła próbki w ośrodku 2 (2416), która była analizowana przez CDC, w Atlancie w stanie Georgia, i była zidentyfikowana jako *M. avium* complex metodą HPLC. Wzór lekowrażliwości tych organizmów był nietypowy dla przedstawiciela z grupy *M. avium* complex, wyniki badań biochemicznych były również atypowe.

Ośrodek 3 miał początkowo 17 rozbieżności. Dwie z tych rozbieżności (7755, 5113) dotyczyły błędnej identyfikacji, szczepy zostały zbadane ponownie metodą HPLC oraz GLC i zidentyfikowane jako *M. nonchromogenicum*. Trzy hodowle usunięto z dalszych badań, ponieważ dwie z nich były mieszane (4750, 8168), a jedna hodowla nie pasażowała się (0601). Dwie inne hodowle były wykluczone z oceny, ponieważ nie udało się zdefiniować ich ostatecznie jako MAC: 2344 i 5124 zostały

zidentyfikowane jako „najbardziej przypominające MAC.” Wyniki HPLC siedmiu z dziesięciu pozostałych rozbieżności otrzymano z CDC, Atlanta, Georgia. Szczepy PE09 oraz 6458 zostały zidentyfikowane jako *M. xenopi* 2, podczas gdy 9714 i 8310 zidentyfikowano jako *M. terrae* complex. Rozbieżności dotyczące szczepów 1264 i 3634 zostały wyjaśnione badaniem w CDC, szczepy zidentyfikowano jako *M. scrofulaceum* w oparciu o wzorce HPLC. Szczep 1264 przedstawiał wzorzec SC007 podczas gdy szczep 3634 był zgodny ze wzorcem EM002. Szczep 0214 zidentyfikowano jako *M. simiae*, natomiast 8153 został potwierdzony jako MAIS wzorcem HPLC EM005.

Izolaty 2888 i 2971 określono jako „nie zidentyfikowane skotochromogeny.” Przedstawiciele *M. avium* complex nie należą do grupy mykobakterii skotochromogennych.

Podsumowując, ogólnie czułość wyniosła 99.9%, i specyficzność 100%, a procent zgodności jest 99.9%.

W oddzielnej ocenie 148 szczepów MAC rzadko izolowanych, wysłano do referencyjnych laboratoriów, w związku z trudnościami w identyfikacji, 120 zareagowało pozytywnie z sondą *M. avium* complex. Dwadzieścia dziewięć izolatów dało wynik negatywny z sondą. Te izolaty były następnie przebadane przez CDC. Status taksonomiczny rzadko izolowanych szczepów *M. avium* complex był również sprawdzany przez International Working Group in Mycobacterial Taxonomy.

CHARAKTERYSTYKA PROCESÓW

A. POWTARZALNOŚĆ

Powtarzalność przebiegu TESTU DO IDENTYFIKACJI HODOWLI MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE obliczano na podstawie ANALIZY dwóch stężeń rybosomalnego RNA wyizolowanego z *M. avium* i *M. intracellulare* lub rRNA *M. avium* complex nie pochodzącego z *M. avium* i nie pochodzącego z *M. intracellulare*, stosując 12 powtórzeń dla pojedynczego oznaczenia.

Próbka	<i>Mycobacterium avium</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	12	12
Średnia wartość impulsu	67,574	112,246
Odchylenie standardowe	2,900	3,429
Współczynnik zmienności	4.3%	3.1%

Próbka	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	12	12
Średnia wartość impulsu	61,758	100,736
Odchylenie standardowe	3,941	3,275
Współczynnik zmienności	6.4%	3.3%

Próbka	<i>M. avium complex</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	12	12
Średnia wartość impulsu	64,148	113,049
Odchylenie standardowe	3,384	3,249
Współczynnik zmienności	5.3%	2.9%

B. ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność oceniano na podstawie analizy takich samych dwóch stężeń rybosomalnego RNA *M. avium*, *M. intracellulare* bez - *M. avium*, bez- *M. intracellulare* *M. avium* complex stosując 10 kolejnych powtórzeń dla jednej próby.

Próbka	<i>Mycobacterium avium</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	10	10
Średnia wartość impulsu	65,790	125,506
Odchylenie standardowe	4,535	9,115
Współczynnik zmienności	6.9%	7.3%

Próbka	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	10	10
Średnia wartość impulsu	60,175	104,203
Odchylenie standardowe	6,339	9,239
Współczynnik zmienności	10.5%	8.9%

Próbka	<i>M. avium complex</i>	
	A	B
Liczba powtórzeń	10	10
Średnia wartość impulsu	64,187	111,197
Odchylenie standardowe	4,659	10,011
Współczynnik zmienności	7.3%	9.0%

C. SWOISTOŚĆ

Wszystkie izolowane hodowle szczepu 122 ATCC były oceniane przy użyciu TESTU DO IDENTYFIKACJI HODOWLI MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE. Te izolaty reprezentowały 93 gatunki z 37 rodzajów. Przy pomocy tego testu oznaczono również trzy izolaty *M. avium complex*, 60 izolatów z 55 innych gatunków Mycobacterium, i 59 izolatów z 36 innych rodzajów reprezentujących przekrój filogenetyczny organizmów. Jedynie izolaty *Mycobacterium avium complex* badane przy użyciu TESTU DO IDENTYFIKACJI MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE dawały pozytywny wynik. Inne gatunki Mycobacterium oraz izolaty spokrewnione filogenetycznie nie reagowały w tym teście.

D. ODZYSKIWANIE

Ribosomalne RNA *M. avium*, *M. intracellulare* i *M. avium complex*, każde w stężeniu od 2.5×10^{-3} mg to 4.0×10^{-2} mg na jeden test było analizowane w obecności 15 mln. komórek Mycobacterium terrae, M. simiae, lub Nocardia asteroides. Nie zaobserwowano interferencji między sygnałem *M. avium complex* i innymi badanymi organizmami w TESTIE DO IDENTYFIKACJI KULTURY MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX ACCUPROBE.

Wyprodukowane przez



Hologic, Inc.

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



Emergo Europe
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

102902F-01-PL Rev. 002

©1990 - 2017 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.
2017-06