

88-0945-1
Revised: May 1999**BBL™ SEPTI-CHEK™**
Blood Culture Bottle with Resins
For Use in the Culture of Microorganisms

English:	pages	1	Italiano:	pagine	4
Français :	pages	2	Español:	páginas	5
Deutsch:	Seiten	3	Japanese:	pages	6

INTENDED USE

A qualitative test system for the detection of aerobic and facultative microorganisms (bacteria and yeast) in blood.

SUMMARY AND EXPLANATION

Blood culture is one of the most important and critical procedures performed in the microbiology laboratory. Since blood is normally sterile, the isolation and identification of an organism has great diagnostic significance. Blood cultures are of great importance in diagnosing such conditions as endocarditis, typhoid fever, pneumonia and other diseases characterized by bacteremia.

The use of a biphasic blood culture system has been shown to improve the sensitivity of blood culture over traditional broth media.¹⁻³ When affixed to **BBL™ SEPTI-CHEK™** Blood Culture Bottles after their inoculation with blood, the agar surfaces on the slide allow the subculture of aerobic, facultative and capnophilic microorganisms present in the specimen after the bottle with the slide attached is tilted and further incubated. The presence of resins in blood culture media has been shown to significantly increase the recovery of clinical pathogens from specimens.^{4,5} This increase in recovery is more pronounced in specimens in which antimicrobials are present, but there have also been significant increases in recovery from specimens which do not contain antimicrobials. The **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottle, when used together with the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide, combines both features, and has been shown to be applicable for bacterial isolation in the presence and/or absence of a wide variety of antimicrobials (see "Performance Characteristics"). The presence of both nonselective and selective differential agar media on the slide allows a pre-differentiation of the microorganisms present in the liquid medium of the blood culture bottle.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Blood is collected by venipuncture and transferred aseptically into a **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottle. For optimum recovery, the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide is attached and the system (bottle and slide) inverted 4 – 6 h post inoculation. The slide/bottle unit is incubated without agitation at 35 ± 2°C for a 7-day culture period. The slide is examined daily for growth and the system (bottle and slide) inverted periodically. **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottles are intended for use in recovering organisms in the presence of oxygen, and are not recommended for use in anaerobic culturing. If **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottles are used without the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide, they should be transiently vented after inoculation using a sterile venting unit (see "Availability").

REAGENTS**BBL™ SEPTI-CHEK™ TSB with Resins Culture Bottle**

Approximate Formula* Per L

TSB (Trypticase™ Soy Broth) with Resins – 70 mL

Deionized Water.....	1.00 L	Dextrose	0.6 g
Nonionic Adsorbing Resin	64.0 g	Sodium Polyanetholsulfonate (SPS)	0.50
Soybean-Casein Digest Broth	27.5	Pyridoxal HCl (Vitamin B6)	0.01
Cationic Exchange Resin.....	4.0	Hemin	0.005
Yeast Extract.....	2.5	Menadione.....	0.0005
Sucrose.....	0.8		

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Each culture bottle contains an atmosphere of CO₂.

Precautions: in vitro Diagnostic

SPS inhibits the growth of certain mycoplasmas and should not be used for their isolation.

A number of fastidious and/or SPS sensitive organisms may not grow in media without blood or an appropriate supplement, such as **BACTEC™ FOS™** (Fastidious Organism Supplement) (see "Availability"), or **BBL™ IsoVitaleX™** Enrichment (see "Availability"). Examples of such organisms include *H. influenzae*, *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*.

Do not use bottles that exhibit any cracks or defects.

Inoculated culture bottles should be decontaminated before being discarded.

Observe aseptic technique and use established precautions against microbiological hazards, including the use of gloves throughout all procedures. All specimens should be handled according to CDC/NIH (Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health) recommendations, NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) guidelines or local institution guidelines, for any potentially infectious human serum, blood or other body fluids. Prior to discarding, sterilize specimen containers and other contaminated materials by autoclaving.

Storage: Store culture bottles at 15 – 25°C. Protect from exposure to light.

Physical Indications of Instability: Indications of instability in an uninoculated bottle are the development of turbidity and/or a change in color. Do not use after the expiration date shown on the bottle label.

BBL™ SEPTI-CHEK™ Slides: Approximate Formula* Per L of Processed Water

Agar 1: Chocolate Agar	Agar 2: MacConkey Agar	Agar 3: Malt Agar			
GC Agar Base.....	36.0 g	Peptones	20.0 g	Malt Extract	30.0 g
Hemoglobin Powder	15.0	Agar	18.0	Agar	18.0
BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment	10.0 ml	Lactose.....	10.0		
Granulated Agar	4.0 g	Sodium Chloride.....	5.0		
		Bile Salts.....	1.5		
		Neutral Red	0.03		
		Crystal Violet	0.001		

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Storage: Store slides at 2 – 8°C. Protect from light; avoid temperature fluctuations during storage as this may cause excessive condensation in the tube of the slide.

Physical Indications of Instability: During inspection of the uninoculated (sealed) slides, any colonies in or on the agar surfaces are indications of contamination. Shrunken agar surfaces, agar separated from the tray, or strong color differences of the agar surfaces are signs of deterioration. Slides showing any of the signs mentioned previously should not be used and should be disposed of appropriately. Do not use after the expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The resins present in the **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottles are able to neutralize clinically significant levels of a wide variety of antimicrobials (see "Performance Characteristics"). For optimum results, however, blood samples should be obtained prior to initiating antibiotic therapy. If this is not possible, blood should be drawn immediately before administering the next dose.

In order to detect septicemia with sufficient accuracy, it may be necessary to set up one to three blood cultures at designated time intervals depending on the clinical situation.

Skin Preparation: To avoid the potential of false-positive blood cultures (e.g., with *Staphylococcus epidermidis*), the puncture site must be cleaned thoroughly and disinfected. Cleanse the venipuncture site with a swab soaked in 70% isopropyl or ethyl alcohol and disinfect the site with a 2% iodine solution. Let the skin dry before venipuncture. The venipuncture site, once disinfected, should not be touched to avoid renewed contamination. After venipuncture, any residual iodine should be removed.

Collection of Blood: Using a needle and syringe, or the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Blood Collection Adaptor (see "Availability"), obtain approximately 8 – 10 mL of patient's blood for each 70 mL **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottle. Due to the concern about contracting infectious disease, consult CDC or NCCLS recommendations on blood collection.^{6,7}

PROCEDURE

Materials Provided: **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottles (see "Availability").

Materials Not Provided: **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slides, needle and syringe (or appropriate blood collection unit), isopropyl or ethyl alcohol (70%), iodine solution (2%), incubator (35 ± 2°C), sterile venting units (see "Availability"), inversion rack (see "Availability"), disposable absorbent pads, **BACTEC™ FOS™** Supplement, **BBL™ IsoVitaleX™** Enrichment, and autoclave.

Performance of the Test:

1. Prepare and label the appropriate culture bottle.
2. DO NOT UNSCREW THE CAP. Remove the protective top of the screw cap on the culture bottle.
3. Disinfect the visible part of the rubber stopper with isopropyl or ethyl alcohol (70%) and allow to dry.
4. Obtain approximately 8 – 10 mL of patient's blood per bottle using a needle and syringe or blood collection unit.
5. Transfer immediately to the culture bottle under aseptic conditions; mix contents gently by repeated inversion.
6. If using the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide (recommended use), perform the following:

Use aseptic technique throughout. It is recommended that these steps be performed in a biosafety cabinet (class II).

After the inoculated blood culture bottle is incubated for 4 – 6 h at 35 ± 2°C:

- A. Prepare and label one **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide; attach the label in such a way that the agar surfaces are still visible.
 - B. Unscrew the cap of the **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottle.
 - C. Unscrew the unlabelled cap of the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide and screw the slide unit onto the thread of the culture bottle. FINGER TIGHTEN ONLY. CHECK THAT THE CAP OF THE SLIDE IS FIXED TIGHTLY. Place bottles with slides into an inversion rack, if desired (see "Instructions for 70 mL Bottle Inversion Rack").
 - D. Tip the whole system (combined bottle and slide) and rotate it 180° around the longitudinal axis to allow complete flooding of the agar surfaces. DO NOT HOLD THE SYSTEM INVERTED FOR MORE THAN 15 SEC, AND DO NOT SHAKE. ALSO, DO NOT PLACE THE SYSTEM INVERTED ON THE BENCH SURFACE. Revert into an upright position (slide up, bottle down).
 - E. Incubate the system for 18 – 24 h at 35 ± 2°C.
7. If the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide is NOT used, the culture bottle must be transiently vented using a sterile venting unit prior to incubation at 35 ± 2°C. Follow the venting procedure described in the following section on "Venting". After the bottle has been vented, mix contents two or three times by gentle inversion, using an inversion rack, if desired (see "Instructions for 70 mL Bottle Inversion Rack").

Instructions for 70 mL Bottle Inversion Rack: The rack holds up to 12 bottles with or without **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slides. The bottle restraining piece of the rack is moved up and down with the hinged action.

1. Place the rack on bench with hinged piece on top.
2. Grasp the hinged piece at the unhinged end of the frame and pull up, forcefully if necessary.
3. Place each bottle into an individual compartment.
4. Close the hinged piece over the bottles and push down, forcefully if necessary, until the hinged piece is fully closed and secured at the unhinged end of the rack.
5. Invert the rack as described above.

Subculturing using the BBL™ SEPTI-CHEK™ Slide:

- A. After 18 – 24 h of incubation, check the agar surfaces of the slide from the outside for indication of growth (refer to "Results and Interpretation"). If transparency of the slide is inhibited by condensing water, carefully remove the slide from the tube, as outlined in paragraph D.

NOTE: CARE MUST BE TAKEN NOT TO CONFUSE COLONIES OF MICROORGANISMS WITH RESIN BEADS WHICH MAY BE DEPOSITED ON THE AGAR SURFACES.

- B. If growth has not occurred, inversion and reversion of the system to flood the agar surface and subsequent incubation is to be repeated once a day for 7 days. Do not flood the agar surfaces more than once a day. Once colonies have formed on the agar surfaces, further inversion of the system is not recommended.
- C. If growth on any of the agar surfaces is confluent, smeared or mixed, subculturing should be performed.

Use aseptic techniques, preferably in a class II biosafety cabinet. It is recommended that the following step be performed over a plastic lined absorbent paper sheet or pad to contain any resin beads which may fall out during the procedure. When subculturing is complete, dispose of the sheet or pad as infectious waste.

- D. Carefully unscrew the cap with colored label of the slide and remove the agar tray. Without touching the agar surfaces, hold the tray by the cap with colored label and using an inoculating loop, remove enough colony mass to perform appropriate procedures for subculturing, identification and suscep-

tibility testing of the isolate(s) as outlined in "Results and Interpretation". Alternatively, the tray can be inverted and placed with the labeled cap on the bench surface. After subculturing, return the tray into the tube, close and finger-tighten.

- E. If, after the agar tray has been removed, no microbial growth is observed, the tray may be carefully replaced in the chamber and the system returned for further incubation following inversion to flood the agar surfaces.

NOTE: Check to see that no resin beads are in the cap threads, as this may allow the slide chamber to leak during subsequent inversions. Aseptically remove any resin beads that are in the cap threads before returning the slide to the chamber.

Subculturing Using the Conventional Methods: Following inoculation and incubation of the culture bottle, observe daily for turbidity, hemolysis, gas formation, color changes and other evidence of microbial growth. If growth is detected, and a **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide is NOT attached, it is necessary to vent the bottle prior to subculturing in order to release gas which often builds up due to microbial metabolism. After venting, prepare a Gram-stained smear and use appropriate subculture methods.

Venting: Venting should be performed in a biological safety cabinet. If possible and appropriate, protective clothing should be worn. Place the bottle in an upright position and place an alcohol wipe over the septum. Insert a sterile needle with an appropriate filter or pledget through the alcohol wipe and septum. The insertion and withdrawal of the needle should be done in a straight-line, avoiding any twisting motions. Discard the needle in an appropriate sharps container.

Quality Control:

BBL™ SEPTI-CHEK™ TSB with Resins Culture Bottle: The following suggested microorganisms may be used for the quality control testing: *Streptococcus pneumoniae* (ATCC® 6305) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Inoculate the broth with a bacterial inoculum containing approximately 300 CFU/ml. Vent the bottles using a sterile venting unit (see "Venting") and incubate at 35 ± 2°C. Observe bottles for evidence of microbial growth. Retest any organism which fails to grow within five (5) days. If the retest also fails to show growth, call Technical Services.

BBL™ SEPTI-CHEK™ Slide: For the quality control testing of the slide, inoculate a Chocolate Agar or TSA with 5% sheep blood plate with the test strains. Incubate 18 – 24 h aerobically in a CO₂-enriched atmosphere at 35 ± 2°C. Using TSA Broth, prepare serial dilutions of the test strains. Inoculate a **BBL™ SEPTI-CHEK™** bottle with a bacterial inoculum of 500 – 1000 CFU/ml. Mix gently. Affix a **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide to the bottle. Tip the system to inoculate the slide completely. Revert the system and incubate for 24 h. After incubation, growth of the following suggested test organisms should be visible on the slides:

Microorganism	Agar 1	Agar 2	Agar 3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC™ 6305	Growth	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Growth	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Growth	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Growth	Growth	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Growth	—	Growth

*May require 48 h for visible growth.

Properly dispose of all units used in quality control testing.

RESULTS AND INTERPRETATION

If present, bacterial growth usually becomes evident within 48 h; however, cultures should be incubated for at least 7 days before results are reported as negative. If a **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide is NOT used, the presence of microorganisms must be further confirmed by subculturing on suitable media and by performing appropriate identification procedures.

If a **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide is used, growth on the agar surfaces usually becomes visible when organisms in the blood culture have reached approximately 500 CFU/ml. If the concentration of organisms at the time of the first slide subculture (tipping of the system) is above 10⁶ CFU/ml, the growth on the slide may be confluent. Typical colony morphology will not be observed with confluent growth, which may appear as a thin film on the agar surface.

The three different agar media in the slide in many cases allow a pre-differentiation of the isolate, provided the specimen is a pure culture.

Agar 1 (Chocolate Agar) is an optimal medium for the recovery of a broad range of microorganisms, including gram-negative and gram-positive bacteria, fastidious organisms such as *Neisseria* and *Haemophilus* spp., and yeasts.

Agar 2 (MacConkey Agar) is a selective differential medium for *Enterobacteriaceae* and certain nonfermenters such as *Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positive bacteria are inhibited.

Agar 3 (Malt Agar) is a selective medium for fungi and yeasts. Bacterial growth is usually inhibited.

Terminal subculture of the broth onto chocolate agar and incubation for 2 days may be performed to confirm low levels of growth on the slide or to evaluate an unusual appearance of the broth; however, it is not required.

Growth from the slides should be subcultured onto appropriate media, such as Chocolate Agar and TSA Agar with 5% sheep blood, incubated in an aerobic atmosphere enriched with CO₂. Also, a smear with subsequent Gram stain and microscopy can be performed directly from growth on the surface of the slide agar(s). Microscopic examination is also recommended to assure the presence of a pure culture. Appropriate identification tests and usually a susceptibility test of the isolate(s) should be performed.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

In order to detect septicemia with sufficient accuracy, it is necessary to prepare 1 – 3 pairs of blood cultures (aerobic, anaerobic) at consecutive time intervals. No single culture can rule out the presence of microorganisms in blood.

Factors that may affect the growth of clinically significant organisms in the broth and on the slide include antimicrobial therapy prior to blood collection, transitory bacteremias, contamination of the blood by exogenous flora or contamination of the blood culture bottle medium during mounting of the slide. Microaerophilic organisms may grow in the liquid medium of the bottle, but may fail to produce sufficient growth on surfaces of the slide. If the bottle medium is turbid, hemolyzed or shows other signs of microbial growth, but media on the tray fail to recover the organism after the system has been tipped and reincubated, subculture from the bottle medium and incubate the subculture plate in an appropriate gas atmosphere (such as provided by a **BBL™ CampyPak™** system) (see "Availability"). Also, strictly anaerobic organisms will not grow on the agar surfaces of the slide, but may grow in the liquid medium of the bottle in rare cases.

The growth of certain mycoplasmas is inhibited by sodium polyanetholsulfonate (SPS), and the **BBL™ SEPTI-CHEK™** blood culture system should not be used for their isolation.⁸

Neutralization of antimicrobial activity by resins varies depending on dosage level and timing of specimen collection. For information on antimicrobial agents neutralized by resins, contact Technical Services at the toll free number listed below.

Culture media sometimes contain small numbers of nonviable organisms derived from medium constituents, which may be visible in smears of uninoculated blood culture media. Other sources of nonviable organisms visible upon Gram staining include staining reagents, immersion oil, glass slides and the specimens used for inoculation. If there is uncertainty about the validity of the Gram stain, the culture should be reincubated for an additional hour or two and the smear and staining procedure repeated before a report is issued.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins Culture Bottle and **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide when used together permit the isolation of aerobic and facultative microorganisms.

Seeded culture studies were performed using inoculum levels of 10 – 100 CFU per bottle. The following is a list of the organisms which grew in **BBL™ SEPTI-CHEK™** TSB with Resins together with the **BBL™ SEPTI-CHEK™** Slide for which growth was observed within a five (5) day period.

Acinetobacter anitratus ATCC 33498
Alcaligenes faecalis ATCC 8750
Candida albicans ATCC 18804
Enterobacter cloacae ATCC 35030
Enterococcus faecalis ATCC 29212
Escherichia coli ATCC 25922
*Haemophilus influenzae** ATCC 10211
*Haemophilus influenzae** ATCC 19418
Klebsiella pneumoniae ATCC 33495

*Neisseria gonorrhoeae*** ATCC 43069
*Neisseria meningitidis*** ATCC 13090
Providencia stuartii ATCC 33672
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305
Streptococcus pyogenes ATCC 19615
Xanthomonas maltophilia ATCC 13637

*addition of **BBL™ IsoVitalEx™** Enrichment

addition of 3.5 mL fresh blood or **BACTEC™ FOS™ Supplement

Internal studies† have shown that antimicrobials are effectively neutralized by the resins used in **BACTEC** resin media. In these tests, antimicrobials were added in clinically relevant concentrations directly to resin media prior to inoculation with susceptible strains. These tests were performed in parallel using non-resin media as controls. Penicillins, cephalosporins (1st, 2nd, and 3rd generation), macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones, lincomycins, tetracycline and chloramphenicol are among the antimicrobial agents neutralized by the resins.

†Data on file, Becton Dickinson Microbiology Systems.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
243189	BBL™ SEPTI-CHEK™ TSB (Trypticase™ Soy Broth) with Resins Culture Bottle, 10 x 70 mL bottles.
243181	BBL™ SEPTI-CHEK™ Slide (Chocolate Agar, MacConkey Agar and Malt Agar), Blood Culture/Subculture Slide, 10 slides.
243500	BBL™ SEPTI-CHEK™ Slide (Chocolate Agar, MacConkey Agar and Malt Agar), Blood Culture/Subculture Slide, 50 slides.
243563	BBL™ SEPTI-CHEK™ Blood Collection Adaptor, Box of 50.
243247	Inversion Rack, 70 mL bottle, Pkg. of one.
271056	Sub/Venting Units for Culture Bottles, Box of 100.

REFERENCES

- Pfaller, M.A., et al. 1982. *Clinical laboratory comparison of a slide blood culture system with a conventional broth system*. J. Clin. Microbiol., 16:525-530.
- Weinstein, M.P., et al. 1985. *Controlled evaluation of Trypticase Soy Broth in Agar Slide and conventional Blood Culture Systems*. J. Clin. Microbiol., 21:626-629.
- Weinstein, M.P., et al. 1985. *Clinical comparison of an Agar Slide Blood Culture Bottle with Tryptic Soy Broth and a conventional Blood Culture Bottle with supplemented Peptone Broth*. J. Clin. Microbiol., 21:815-818.
- Wallis, C., et al. 1980. *Rapid isolation of bacteria from septicemic patients by use of an antimicrobial agent removal device*. J. Clin. Microbiol., 11:462-464.
- Appelbaum, P.C., et al. 1983. *Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium*. J. Clin. Microbiol., 17:48-51.
- Centers for Disease Control. 1989. *Guidelines for Prevention of Transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus to Health-Care and Public-Safety Workers*. Morbid. Mortal. Weekly Report 38 (S-6):1-37.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1991. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, 2nd Edition*; Tentative Guideline. NCCLS Document M29-T2. NCCLS, Villanova, Pa.
- Evans, G.L. et al. 1967. *Growth inhibition of mycoplasmas by sodium polyanethol sulphate*. Antimicrob. Agents Chemother. 1967: 687-691.

TECHNICAL INFORMATION: In the United States, telephone Technical Services, toll free (800) 638-8663.



© 1999 Becton Dickinson and Company
 BACTEC, BBL, CampyPak, FOS, IsoVitalEx and SEPTI-CHEK are trademarks of Becton Dickinson and Company.
 ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

**BECTON
 DICKINSON**

Becton Dickinson Microbiology Systems
 Becton Dickinson and Company
 7 Loveton Circle
 Sparks, Maryland 21152 USA

Becton Dickinson France S.A.
 11 rue Aristide Bergès
 38800 Le Pont de Claix, France



MADE
 IN
 U.S.A.

88-0945-1
Révisé : 05-99

Produit enregistré auprès de l'ADM

FRANÇAIS

BBL SEPTI-CHEK

Flacon d'hémoculture avec résines

Destiné à la culture de microorganismes

APPLICATION

Test qualitatif pour la détection de microorganismes aérobies et facultatifs (bactéries et levures) dans le sang.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'hémoculture est une des méthodes les plus importantes et les plus délicates à réaliser dans un laboratoire de microbiologie. Le sang étant normalement stérile, l'isolement et l'identification d'un microorganisme ont une signification diagnostique considérable. L'hémoculture a une importance capitale dans le diagnostic de l'endocardite, la fièvre typhoïde, la pneumonie ainsi que d'autres maladies caractérisées par une bactériémie.

Il a été montré que l'utilisation d'un système biphasique d'hémoculture améliorerait la sensibilité des hémocultures par comparaison avec des milieux bouillons traditionnels.¹⁻³ Une fois attachées aux flacons d'hémoculture **BBL SEPTI-CHEK** après leur inoculation avec du sang, les surfaces gélosées de la lame permettent un repiquage des microorganismes aérobies, facultatifs et capnophiles présents dans l'échantillon après que la lame a été inclinée et incubée. Il a aussi été démontré que la présence de résines dans le milieu d'hémoculture augmente significativement le taux d'isolement des pathogènes ayant une importance clinique à partir des échantillons.^{4,5} Cette augmentation du taux d'isolement est plus importante dans le cas d'échantillons contenant des antibiotiques. Cependant, il y a aussi eu des augmentations significatives du taux d'isolement à partir d'échantillons exempts d'antibiotiques. Le flacon de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines lorsque utilisé conjointement avec les lames **BBL SEPTI-CHEK** combine ces deux aspects. Il a été démontré qu'il peut être utilisé pour l'isolement bactérien en présence ou en absence d'une grande variété d'antibiotiques (voir "Caractéristiques de performance"). La présence simultanée sur la lame de milieux sélectifs différentiels et non-sélectifs permet une différenciation préliminaire des microorganismes présents dans le milieu liquide du flacon d'hémoculture.

PRINCIPE DE LA METHODE

Le sang est prélevé par ponction veineuse et transféré aseptiquement dans un flacon de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines. Pour obtenir un taux d'isolement optimal, la lame **BBL SEPTI-CHEK** est attachée et le système (flacon et lame) inversé 4 – 6 h après l'inoculation. Le système flacon/lame est incubé sans agitation à 35 ± 2 °C pendant 7 jours de culture. La lame est examinée quotidiennement pour détecter une croissance et le système (flacon et lame) inversé périodiquement. Les flacons de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines sont destinés à l'isolement de microorganismes en présence d'oxygène et ils ne sont pas recommandés pour les cultures anaérobies. Si les flacons de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines sont utilisés sans la lame **BBL SEPTI-CHEK**, ils devraient être ventilés de façon momentanée après l'inoculation à l'aide d'un système de ventilation stérile (voir "Matériel disponible").

REACTIFS

Flacons de culture BBL SEPTI-CHEK TSB avec résines

Formule approximative* par L

TSB (Bouillon **Trypticase** soja) avec résines – 70 mL

Eau désionisée	1,00 L	Dextrose.....	0,6 g
Résine absorbante non-ionique	64,0 g	Polyanetholsulfonate de sodium (PSS).....	0,50
Bouillon digéré de soja caséine	27,5	Hydrochlorure de pyridoxal (Vitamine B6)	0,01
Résine d'échange cationique.....	4,0	Hémine	0,005
Extrait de levure	2,5	Ménadione.....	0,0005
Sucrose	0,8		

*Ajustée et/ou supplémentée en fonction des critères de performance imposés.

Chaque flacon de culture contient une atmosphère de CO₂.

Précautions : Diagnostic *in vitro*

Le PSS inhibe la croissance de certains mycoplasmes ; il ne devrait pas être utilisé lors de leur isolement.

Un certain nombre de microorganismes difficiles et/ou sensibles au PSS peuvent ne pas se développer dans des milieux ne contenant pas de sang ou de supplément approprié ; tels que **BACTEC FOS** (supplément pour microorganismes difficiles) (voir "Matériel disponible") ou enrichissement **BBL IsoVitalex** (voir "Matériel disponible"). Des exemples de ces types de microorganismes comprennent *H. influenzae*, *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*.

Ne pas utiliser les flacons présentant des fissures ou d'autres défauts.

Décontaminer les flacons de culture inoculés avant de les jeter.

Observer à tout moment les techniques aseptiques et les précautions en vigueur en matière de lutte contre les dangers microbiologiques, y compris le port de gants durant toutes les procédures. Tous les échantillons devront être manipulés en suivant les recommandations du CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/ National Institutes of Health) et les directives du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) ou celles des laboratoires pour le sérum humain, le sang ou d'autres liquides physiologiques potentiellement infectieux. Avant de les jeter, stériliser à l'autoclave tous les récipients ayant contenu des échantillons ainsi que tout le matériel contaminé.

Conservation : conserver les flacons de culture entre 15 et 25 °C. Protéger de la lumière.

Indications physiques d'instabilité : la turbidité et/ou le changement de couleur sont les indications d'instabilité des flacons non-inoculés. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Lames BBL SEPTI-CHEK : formule approximative* par L d'eau traitée

Gélose 1 : Gélose chocolat	Gélose 2 : Gélose MacConkey	Gélose 3 : Gélose malt			
Base de gélose (GC.....)	36,0 g	Peptones	20,0 g	Extrait de malt	30,0 g
Poudre d'hémoglobine	15,0	Gélose	18,0	Gélose	18,0
Supplément BBL IsoVitalax	10,0 ml	Lactose	10,0		
Gélose en granules.....	4,0 g	Chlorure de sodium.....	5,0		
		Sels biliaires	1,5		
		Rouge neutre.....	0,03		
		Violet de cristal.....	0,001		

*Ajustée et/ou supplémentée en fonction des critères de performance imposés.

Conservation : conserver les lames entre 2 et 8 °C. Protéger de la lumière ; éviter les fluctuations de température durant la conservation car elles peuvent causer une condensation excessive dans le tube contenant la lame.

Indications physiques d'instabilité : lors de l'inspection des lames non-inoculées (scellées), toute présence de colonies à la surface ou à l'intérieur de la gélose indique une contamination. Les signes de détérioration comprennent : surfaces gélosées rétrécies, décollées de la plaque, ou présentant de fortes variations de couleur. Les lames présentant l'un quelconque des signes énumérés précédemment ne doivent pas être utilisées et doivent être jetées de façon appropriée. Ne pas utiliser après la date de péremption.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Les résines présentes dans les flacons de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines sont capables de neutraliser des niveaux cliniquement significatifs d'une grande variété d'antibiotiques (voir "Caractéristiques de Performance"). Cependant, afin d'obtenir des résultats optimaux, les échantillons de sang doivent être prélevés avant la mise en place d'une antibiothérapie. En cas d'impossibilité, le sang devra être prélevé immédiatement avant l'administration d'une nouvelle dose.

Afin de détecter toute septicémie avec suffisamment de précision, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer une à trois hémocultures à intervalles donnés, en fonction de l'état clinique du patient.

Préparation cutanée : afin d'éviter tout risque d'obtention d'hémocultures faussement positives (par exemple contaminées par *Staphylococcus epidermidis*), le site de ponction veineuse doit être parfaitement propre et désinfecté. Nettoyer le site de ponction veineuse à l'aide d'un tampon imbibé d'alcool isopropylique ou éthylique à 70 % et désinfecter avec une solution iodée à 2 %. Laisser sécher la peau avant d'effectuer la ponction. Une fois désinfecté, ne pas toucher le site de ponction veineuse afin d'éviter toute nouvelle contamination. Lorsque la ponction veineuse est terminée, éliminer toute trace d'iode.

Prélèvement du sang : à l'aide d'une aiguille et d'une seringue ou de l'adaptateur pour prélèvement sanguin **BBL SEPTI-CHEK** (voir "Matériel disponible"), obtenir environ 8 – 10 mL de sang pour chaque flacon de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines de 70 mL. Compte tenu des inquiétudes liées à la transmission de certaines maladies infectieuses, il est conseillé de prendre connaissance des recommandations émises par le CDC ou le NCCLS en matière de prélèvements d'échantillons sanguins.^{6,7}

METHODE

Matériel fourni : flacons de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines (voir "Matériel disponible").

Matériel non-fourni : lames **BBL SEPTI-CHEK**, aiguille et seringue (ou autre système approprié de prélèvement sanguin), alcool isopropylique ou éthylique à 70 %, solution iodée à 2 %, incubateur (35 ± 2 °C), unités de ventilation stériles, (voir "Matériel disponible"), portoir d'inversion (voir "Matériel disponible"), tampons absorbants à usage unique, supplément **BACTEC FOS**, enrichissement **BBL IsoVitalex**, et un autoclave.

Réalisation du test :

- Préparer et coller l'étiquette sur le flacon de culture approprié.
- NE PAS DEVISSER LE BOUCHON. Retirer la protection située sur la partie supérieure du bouchon du flacon de culture.
- Désinfecter la partie visible du bouchon de caoutchouc à l'aide d'alcool isopropylique ou éthylique à 70 % et laisser sécher.
- A l'aide d'une aiguille et d'une seringue ou d'un système de prélèvement sanguin, obtenir environ 8 – 10 mL de sang par flacon.
- Transférer immédiatement le sang dans le flacon de culture en respectant les règles d'asepsie, mélanger le contenu par inversion répétée.
- Si une lame BBL SEPTI-CHEK est utilisée (usage recommandé), effectuer les manipulations suivantes :**
En tout temps utiliser des techniques aseptiques. Il est recommandé que les manipulations suivantes soient effectuées sous une hotte biologique de sécurité (classe II).
Après avoir inoculé les flacons d'hémoculture pendant 4 – 6 h à 35 ± 2 °C :
 - Préparer et étiqueter une lame **BBL SEPTI-CHEK** ; attacher l'étiquette de façon que les surfaces gélosées restent visibles.
 - Dévisser le bouchon du flacon de culture **BBL SEPTI-CHEK** TSB avec résines.
 - Dévisser le capuchon non étiqueté de la lame **BBL SEPTI-CHEK** et visser la lame dans le pas de vis du flacon de culture. VISSER SEULEMENT AVEC LES DOIGTS. VÉRIFIER QUE LE CAPUCHON DE LA LAME EST FERMEMENT FIXE. Mettre les flacons avec lames dans un portoir si voulu (voir "Instructions pour le portoir d'inversion (flacon de 70 mL)").
 - Incliner tout le système (flacon et lame combinés) et le faire pivoter à 180 ° sur son axe longitudinal pour complètement recouvrir les surfaces gélosées. NE PAS MAINTENIR LE SYSTEME A L'ENVERS PLUS DE 15 SEC. ET NE PAS AGITER. DE PLUS NE PAS PLACER LE SYSTEME A L'ENVERS SUR LE PLAN DE TRAVAIL. Remettre le flacon en position verticale (lame en haut, flacon en bas).
 - Incuber le système pendant 18 – 24 h à 35 ± 2 °C.
- Si une lame BBL SEPTI-CHEK n'est PAS utilisée**, le flacon de culture doit être ventilé à l'aide d'un système de ventilation stérile avant d'être mis à incuber à 35 ± 2 °C. Suivre la méthode de ventilation décrite à la rubrique "Ventilation". Après avoir ventilé, mélanger le contenu par inversion douce deux à trois fois, en utilisant un portoir d'inversion si voulu (voir "Instructions pour le portoir d'inversion (flacon de 70 mL)").

Instructions pour le portoir d'inversion (flacon de 70 mL) : Le portoir d'inversion a une capacité de 12 flacons avec ou sans lames **BBL SEPTI-CHEK**. La partie du portoir retenant les flacons se lève et se rabaisse grâce à un système de charnières.

- Mettre le portoir sur le plan de travail la partie avec charnières sur le dessus.
- Tenir la partie avec charnières à l'extrémité sans charnières et relever, avec force si nécessaire.
- Mettre un flacon dans chaque compartiment.
- Rabattre la partie avec charnières sur les flacons et appuyer, avec force si nécessaire, jusqu'à ce que la partie à charnières soit bien en place et bien refermée sur l'extrémité sans charnières du portoir.
- Renverser le portoir comme décrit ci-dessus.

Repiquage employant la lame BBL SEPTI-CHEK :

- Après 18 – 24 h d'incubation, examiner de l'extérieur la surface des géloses pour détecter des signes de croissance (voir "Résultats et Interprétation"). Si la transparence de la lame est gênée par une condensation d'eau, retirer avec précaution la lame du tube selon la procédure succinctement décrite dans le paragraphe D.
- NOTA : FAIRE ATTENTION DE NE PAS CONFONDRE DES COLONIES MICROBIENNES ET DES GRAINS DE RESINE QUI PEUVENT S'ETRE DEPOSES EN SURFACE DES GELOSES.
- En l'absence de croissance, une fois par jour pendant 7 jours, inverser le système afin d'immerger la surface des géloses et puis ramener à la position initiale et réincuber. Ne pas immerger la surface des géloses plus d'une fois par jour. Une fois que les colonies se sont formées à la surface des géloses, une inversion ultérieure du système n'est pas recommandée.
- Si la croissance à la surface des géloses est confluyente, floue ou mixte, un repiquage devrait être effectué.

Utiliser des techniques aseptiques, de préférence sous une hotte biologique de sécurité classe II. Il est recommandé que l'étape suivante soit effectuée au-dessus d'une feuille de papier absorbant ou d'un tampon avec endos de plastique afin de contenir les grains de résine qui pourraient tomber durant les manipulations. Lorsque le repiquage est terminé, éliminer le papier absorbant ou le tampon comme du matériel infectieux.

- Dévisser avec précaution le bouchon avec l'étiquette de couleur de la lame et retirer la plaque des géloses. A l'aide d'une anse d'inoculation, sans toucher la surface des géloses et en tenant la plaque par le bouchon

rouge, prélever suffisamment de colonies afin de pouvoir effectuer les procédures appropriées de repiquage, d'identification et de test de sensibilité aux antibiotiques d'un ou de plusieurs isolats telles que décrites dans "Résultats et Interprétation". Une autre possibilité consiste à retourner la plaque et à la placer avec le bouchon étiqueté sur le plan de travail. Après un repiquage la plaque est remise dans le tube qui est alors fermé et serré manuellement.

- E. Si après avoir retiré la plaque des géloses aucune croissance n'est observée, la plaque peut être soigneusement remplacée dans la chambre. Le système est ensuite inversé afin d'immerger la surface des géloses et réincubé.

NOTA : vérifier l'absence de grains de résine dans le pas de vis du bouchon car ceci pourrait occasionner des fuites lors de l'inversion subséquente de la chambre contenant la lame. Retirer aseptiquement tout grain de résine dans le pas de vis du bouchon avant de remettre la lame dans la chambre.

Repiquage employant les méthodes conventionnelles : suite à l'inoculation et l'incubation du flacon de culture, observer quotidiennement afin de détecter des évidences de croissance microbienne telles que turbidité, une hémolyse, la production de gaz ou un changement de couleur. Dans le cas d'une croissance où une lame **BBL SEPTI-CHEK** n'est PAS attachée, il est nécessaire de ventiler le flacon avant d'effectuer un repiquage afin de libérer les gaz qui auraient pu s'accumuler du fait du métabolisme microbien. Après la ventilation, préparer une coloration de Gram et utiliser les méthodes de repiquage appropriées.

Ventilation : toute ventilation devrait être effectuée sous une hotte biologique de sécurité. Des vêtements protecteurs devraient être portés lorsque cela est possible et approprié. Placer le flacon en position verticale et mettre un tampon imbibé d'alcool sur le septum. Insérer une aiguille stérile à l'aide d'un filtre approprié ou d'une compresse à travers le tampon d'alcool et le septum. L'insertion et le retrait de l'aiguille doivent être effectués selon une ligne droite en évitant tout mouvement de torsion. Jeter l'aiguille dans un contenant approprié pour objets pointus.

Contrôle de qualité :

Flacon d'hémoculture BBL SEPTI-CHEK TSB avec résines : les microorganismes suggérés suivants peuvent être utilisés pour effectuer le contrôle de qualité : *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Inoculer le bouillon avec un inoculum bactérien contenant environ 300 UFC/ml. Ventiler les flacons à l'aide d'un système de ventilation stérile (voir "Ventilation") et incuber à 35 ± 2 °C. Examiner les flacons pour des signes de croissance microbienne. Répéter le test sur tout microorganisme qui ne croît pas en moins de cinq (5) jours. Si la répétition du test ne montre pas une croissance microbienne, contacter votre représentant local de Becton Dickinson.

Lame BBL SEPTI-CHEK : pour effectuer le contrôle de qualité des lames, inoculer une Gélose au chocolat ou une Gélose TSA additionnée de 5 % de sang de mouton avec les souches de test. Incuber à 35 ± 2 °C pendant 18 – 24 h dans une atmosphère enrichie en CO₂. Avec le Bouillon TSA, préparer une série de dilutions des souches de test. Inoculer un flacon **BBL SEPTI-CHEK** avec de l'inoculum bactérien de 500 – 1000 UFC/ml. Mélanger délicatement. Attacher une lame **BBL SEPTI-CHEK** au flacon. Incliner le système pour inoculer complètement la lame. Inverser le système et incuber pendant 24 h. Après incubation, la croissance des microorganismes suivants devrait apparaître sur les lames :

Microorganismes	Gélose 1	Gélose 2	Gélose 3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Croissance	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> * ATCC 13090	Croissance	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Croissance	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Croissance	Croissance	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Croissance	—	Croissance

*Peut demander 48 h pour donner une croissance visible.

Éliminer correctement tous les produits utilisés lors des contrôles de qualité.

RESULTATS ET INTERPRETATION

En cas de prolifération bactérienne, celle-ci est visible sous 48 h. Toutefois, les cultures doivent avoir été incubées au moins 7 jours pour que les résultats soient déclarés négatifs d'une manière définitive. Si une lame **BBL SEPTI-CHEK** n'est PAS utilisée, la présence de microorganismes doit être confirmée en effectuant un repiquage sur un milieu approprié et par la réalisation de procédures d'identification adéquates.

Si une lame **BBL SEPTI-CHEK** est utilisée, la croissance microbienne à la surface des géloses est normalement visible lorsque le nombre de microorganismes dans l'hémoculture atteint environ 500 UFC/ml. Si la concentration d'organismes au moment du premier repiquage (inclinaison du système flacon/lame) est supérieure à 10⁶ UFC/ml, la croissance en surface des lames peut devenir confluyente. La morphologie typique aux colonies ne pourra être observée si la croissance est confluyente. Cette dernière apparaîtra comme un mince film en surface de la gélose.

Dans de nombreux cas, les trois géloses différenciantes présentes sur la lame permettent une différenciation préliminaire de l'isolat, à condition que l'échantillon soit une culture pure.

La **Gélose 1** (Gélose chocolat) est un milieu optionnel utilisé pour l'isolement d'une grande variété de microorganismes, incluant les bactéries gram-négatives et gram-positives, les organismes fastidieux tels *Neisseria* et *Haemophilus* spp. et les levures.

La **Gélose 2** (Gélose MacConkey) est un milieu sélectif et différentiel pour les *Enterobacteriaceae* et certains organismes non-fermenteurs tels *Pseudomonas aeruginosa*. Les bactéries gram-positives sont inhibées.

La **Gélose 3** (Gélose malt) est un milieu sélectif pour les champignons et les levures. La croissance bactérienne est normalement inhibée.

Un repiquage final du bouillon sur Gélose chocolat suivi d'une incubation de 2 jours peut être fait afin de confirmer une croissance faible sur la lame ou pour évaluer une apparence atypique du bouillon ; cependant, cette procédure n'est pas requise.

Une croissance à la surface des lames doit être repiquée sur un milieu approprié tel que la Gélose chocolat et la Gélose TSA additionnée de 5 % de sang de mouton et incubée dans une atmosphère enrichie en CO₂. De plus, un frottis en vue de faire une coloration de Gram suivie d'une observation microscopique peut être fait directement à partir de la croissance en surface de la ou des gélose(s). Une observation microscopique est aussi recommandée afin de s'assurer de la pureté de la culture. Des tests d'identification appropriés et normalement un test de sensibilité aux antibiotiques devraient être faits à partir de l'isolat ou des isolats.

LIMITES DE LA METHODE

Afin de détecter une septicémie avec suffisamment d'exactitude, il est nécessaire d'effectuer 1 – 3 paires d'hémocultures (aérobie, anaérobie) à des intervalles de temps consécutifs. Une seule culture ne permet pas d'éliminer la présence de microorganismes dans le sang.

Les facteurs qui peuvent influencer la croissance de microorganismes ayant une importance clinique considérable dans le bouillon et sur la lame comprennent une thérapie antimicrobienne avant le prélèvement du sang, des bactériémies transitoires, la contamination du sang par une flore exogène ou la contamination du milieu du flacon d'hémoculture pendant le montage de la lame. Des organismes microaérophiles peuvent croître dans le milieu liquide du flacon mais peuvent croître de façon insuffisante sur les surfaces de la lame. Si le milieu du flacon est turbide, hémolysé ou présente d'autres signes de croissance microbienne alors que les milieux de la plaque n'ont pas réussi à isoler l'organisme après inclinaison et réincubation du système, repiquer à partir du milieu du flacon et incuber la plaque de repiquage dans une atmosphère gazeuse appropriée (telle que celle fournie par un système **BBL CampyPak**) (voir "Matériel disponible"). En outre, les organismes strictement anaérobies ne se développeront pas sur les surfaces gélosées de la lame mais dans de rares cas peuvent croître dans le milieu liquide du flacon.

Le polyanéthylsulfonate de sodium (PSS) inhibe la croissance de certains mycoplasmes ; le système d'hémoculture **BBL SEPTI-CHEK** ne devrait pas être utilisé pour effectuer leur isolement.⁸

La neutralisation de l'activité antimicrobienne par les résines peut varier en fonction de la dose et du moment où le prélèvement sanguin est effectué. Pour de plus amples informations quant aux agents antimicrobiens neutralisés par les résines, contacter votre représentant local de Becton Dickinson.

Les milieux de culture contiennent parfois de petites quantités d'organismes non viables provenant des composants du milieu et que l'on peut voir dans les frottis de l'hémoculture non inoculée. Il existe d'autres sources d'organismes non viables que l'on peut voir dans une coloration de Gram, notamment les réactifs de coloration, l'huile à immersion, les lames de verre et les échantillons utilisés pour l'inoculation. En cas de doute quant à la validité de la coloration de Gram, on doit remettre la culture dans l'incubateur pendant une ou deux heures de plus, puis répéter la méthode du frottis et de la coloration avant de préparer un rapport.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Le flacon de culture **BBL SEPTI-CHEK TSB** avec résines et la lame **BBL SEPTI-CHEK** lorsqu'ils sont utilisés conjointement, permettent l'isolement de microorganismes aérobies et aérobies facultatifs.

Des études d'ensemencement de culture ont été menées en utilisant des inoculums avec des niveaux de 10 – 100 UFC par flacon. La liste suivante présente les microorganismes cultivés dans **BBL SEPTI-CHEK TSB** avec résines et pour lesquels on a décelé une croissance sur la lame **BBL SEPTI-CHEK** en moins de cinq (5) jours.

<i>Acinetobacter anitratus</i> ATCC 33498	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ** ATCC 43069
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	<i>Neisseria meningitidis</i> ** ATCC 13090
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 10211	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 19418	<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC 13637
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	

*ajout d'enrichissement **BBL IsoVitaléX**

ajout de 3,5 mL de sang frais ou du supplément **BACTEC FOS

Des études internes[†] ont démontré que les agents antimicrobiens sont neutralisés par les résines utilisées dans le milieu de résine **BACTEC**. Lors de ces tests, les agents antimicrobiens ont été ajoutés en concentrations cliniquement importantes directement au milieu de résine avant l'inoculation des souches sensibles. Ces tests ont été effectués en parallèle en utilisant des milieux sans résine comme témoins. Les pénicillines, céphalosporines (1re, 2e, et 3e génération), macrolides, aminosides, fluoroquinolones, lincosmycines, la tétracycline et le chloramphénicol sont parmi les agents neutralisés par les résines.

†Données disponibles dans les archives de Becton Dickinson Microbiology Systems.

MATERIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description
243189	Flacon de culture BBL SEPTI-CHEK TSB (Bouillon Trypticase soja) avec résines, 10 flacons de 70 mL.
243181	Lame BBL SEPTI-CHEK , (Gélose chocolat, Gélose MacConkey et Gélose malt), lame pour hémoculture/repiquage, 10 lames.
243500	Lame BBL SEPTI-CHEK , (Gélose chocolat, Gélose MacConkey et Gélose malt), lame pour hémoculture/repiquage, 50 lames.
243563	Adaptateur pour prélèvement sanguin BBL SEPTI-CHEK , boîte de 50.
243247	Portoir d'inversion, flacon de 70 mL, 1 par coffret.
271056	Unités de (sous)ventilation pour flacons de culture, coffret de 100.

BIBLIOGRAPHIE : voir la rubrique "References" du texte anglais.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
USA

88-0945-1
Revidiert: 05-99

DEUTSCH

BBL SEPTI-CHEK

Blutkulturflasche mit Kunstharzen

Zur Kultivierung von Mikroorganismen

VERWENDUNGSZWECK

Zum qualitativen Nachweis von aeroben und fakultativen (Bakterien und Hefen) Mikroorganismen in Blut.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Anlage von Blutkulturen ist eines der wichtigsten und kritischsten Verfahren im mikrobiologischen Labor. Da Blut normalerweise steril ist, sind der Nachweis und die Identifizierung eines Mikroorganismus von großer diagnostischer Bedeutung. Blutkulturen sind außerordentlich wichtig zur Diagnose von Erkrankungen wie Endokarditis, Typhus, Pneumonie und anderen, durch Bakteriämie gekennzeichneten Krankheiten.

Es konnte gezeigt werden, daß die Verwendung eines biphasischen Blutkultursystems die Empfindlichkeit der Blutkultur im Vergleich zu traditionellen Bouillon-Medien verbessert.¹⁻³ Nach dem Anbringen auf **BBL SEPTI-CHEK** Blutkulturflaschen, die mit Blut inokuliert wurden, können auf den Agaroberflächen des Agarträgers nach Umdrehen der Blutkulturflasche und des aufgeschraubten Agarträgers und anschließender Inkubation Subkulturen von in der Probe vorhandenen aeroben, fakultativen und kapnophilen Mikroorganismen angelegt werden. Bei Anwesenheit von Kunstharzen in Blutkulturmedien wurde eine deutliche Zunahme der Isolierung klinisch bedeutsamer Krankheitserreger aus Proben festgestellt.^{4,5} Diese Zunahme der Isolierung ist stärker ausgeprägt bei Proben, die antimikrobielle Agenzien enthalten, jedoch wurden auch bei Proben ohne antimikrobielle Agenzien signifikante Zunahmen der Isolierung beobachtet. Bei gemeinsamer Verwendung der **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen und des **BBL SEPTI-CHEK** Agarträgers werden diese beiden Merkmale kombiniert und dieses System hat sich zur Isolierung von Bakterien sowohl in Anwesenheit wie auch Abwesenheit eines breiten Spektrums von antimikrobiellen Agenzien als geeignet erwiesen (s. "Leistungsmerkmale"). Die Anwesenheit von selektiven und nichtselektiven Differenzierungsmedien auf dem Agarträger ermöglicht eine Vordifferenzierung der im flüssigen Medium der Blutkulturflasche vorhandenen Mikroorganismen.

VERFAHRENSPRINZIP

Blut wird mittels Venenpunktion entnommen und aseptisch in eine **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen überführt. Zur Erzielung einer optimalen Ausbeute wird der **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger angebracht und 4 – 6 h nach der Inokulation umgedreht. Die aus Agarträger und Flasche bestehende Einheit wird ohne Schütteln bei 35 ± 2 °C für eine Kulturdauer von 7 Tagen inkubiert. Der Agarträger wird täglich auf Wachstum untersucht und in regelmäßigen Abständen umgedreht. **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflaschen mit TSB und Kunstharzen sind zur Isolierung von Organismen bei Anwesenheit von Sauerstoff vorgesehen und werden nicht zur Verwendung bei anaeroben Kulturen empfohlen. Falls die **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflaschen mit TSB und Kunstharzen ohne **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger verwendet werden, sind die Flaschen nach der Inokulation mit Hilfe einer sterilen Entlüftungseinheit vorübergehend zu entlüften (s. "Lieferbare Produkte").

REAGENZIEN

BBL SEPTI-CHEK Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen

Ungefähre Zusammensetzung* pro L

TSB (Trypticase-Soja-Bouillon) mit Kunstharzen – 70 mL

Deionisiertes Wasser	1,00 L	Dextrose	0,6 g
Nichtionisches Adsorptionskunstharz	64,0 g	Natriumpolyanetholsulfonat (NPS)	0,50
Casein-Soja-Pepton-Bouillon	27,5	Pyridoxal-HCl (Vitamin B6)	0,001
Kationenaustauschharz	4,0	Hämin	0,005
Hefeextrakt	2,5	Menadion	0,0005
Saccharose	0,8		

*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Jede Kulturflasche enthält eine CO₂-Atmosphäre.

Sicherheitshinweise: In-Vitro-Diagnostik

NPS hemmt das Wachstum bestimmter Mykoplasmen und sollte zu deren Isolierung nicht verwendet werden.

Einige anspruchsvolle und/oder NPS-empfindliche Organismen, wie z.B. *H. influenzae*, *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* wachsen u.U. nicht in Medien, die kein Blut oder kein entsprechendes Supplement enthalten wie z.B. **BACTEC FOS**-Supplement, (s. "Lieferbare Produkte"), oder **BBL IsoVitaleX**-Anreicherungsmedium (s. "Lieferbare Produkte").

Flaschen, die Sprünge oder andere Defekte aufweisen, nicht verwenden.

Inokulierte Flaschen müssen vor dem Verwerfen dekontaminiert werden.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen (einschließlich des Tragens von Handschuhen) erfolgen. Alle Proben sollten gemäß den Empfehlungen der CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health) oder des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), sowie den jeweilig bestehenden Laborvorschriften für den Umgang mit potentiell infektiösem Humanserum, -blut oder anderen Körperflüssigkeiten gehandhabt werden. Probenbehältnisse und an dere kontaminierte Materialien vor dem Entsorgen im Autoklaven sterilisieren.

Aufbewahrung: Kulturflaschen bei 15 – 25 °C lagern. Vor Licht schützen.

Physikalische Anzeichen von Verfall: Anzeichen von Verfall einer nicht inokulierten Flasche sind Trübung und/oder Farbumschlag. Verfallsdatum beachten (s. Flaschenetikett).

BBL SEPTI-CHEK Agarträger: Ungefähre Zusammensetzung* pro L deionisiertes Wasser

Agar 1: Schokoladenagar	Agar 2: MacConkey-Agar	Agar 3: Malzagar
GC-Agar-Basis	Peptone	Malzextrakt
36,0 g	20,0 g	30,0 g
Hämoglobin-Pulver	Agar	Agar
15,0	18,0	18,0
BBL IsoVitaleX -Anreicherungsmedium ...	Lactose	
10,0 ml	10,0	
Granulierter Agar	Natriumchlorid	
4,0 g	5,0	
	Gallensalze	
	1,5	
	Neutralrot	
	0,03	
	Kristallviolett	
	0,001	

*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Aufbewahrung: Bei 2 – 8 °C lagern. Vor Licht schützen; Temperaturschwankungen während der Lagerung vermeiden, da dies zu übermäßiger Kondensation im Röhren des Agarträgers führen kann.

Physikalische Anzeichen von Verfall: Während der Überprüfung der nicht inokulierten (versiegelten) Agarträger sind Kolonien in oder auf den Agarflächen Anzeichen von Kontamination. Eingeschrumpfte Agaroberflächen, Agar, das sich von der Schale getrennt hat, oder starke Farbunterschiede auf den Agarflächen sind Anzeichen von Verfall. Agarträger, die die obengenannten Anzeichen aufweisen, dürfen nicht verwendet werden und sind ordnungsgemäß zu entsorgen. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.

PROBENTNAHME UND HANDHABUNG

Die in den **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflaschen mit TSB und Kunstharzen vorliegenden Kunstharze können klinisch bedeutsame Gehalte einer Vielzahl antimikrobieller Agenzien neutralisieren (s. "Leistungsmerkmale"). Zur Erzielung optimaler Ergebnisse sollten Blutproben vor der Einleitung einer Antibiotikatherapie entnommen werden. Falls dies nicht möglich ist, sollte das Blut unmittelbar vor Verabreichung der nächsten Dosis entnommen werden.

Um eine Septikämie mit hinreichender Genauigkeit erfassen zu können, kann die Anlage von 1 – 3 Blutkulturen zu festgelegten Zeitpunkten je nach der klinischen Lage erforderlich sein.

Vorbereitung der Haut: Um die Möglichkeit falsch-positiver Kulturergebnisse (z.B. durch *Staphylococcus epidermidis*) auszuschließen, muß die Punktionsstelle sorgfältig gereinigt und desinfiziert werden. Die Venenpunktionsstelle mit einem in 70 % Isopropyl- oder Äthylalkohol getränkten Tupfer reinigen und danach mit 2%iger Jodtinktur desinfizieren. Vor Durchführung der Venenpunktion die Haut trocknen lassen. Zur Vermeidung einer Rekontamination die Venenpunktionsstelle nach der Desinfizierung nicht mehr berühren. Nach der Venenpunktion sind jegliche Jodrückstände zu entfernen.

Blutentnahme: Mit Hilfe einer Kanüle mit Spritze oder des **BBL SEPTI-CHEK** Adapters zur Blutentnahme (s. "Lieferbare Produkte") etwa 8 – 10 mL Patientenblut für jede 70 mL **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen entnehmen. Wegen möglicher Infektionsgefahr sind die Empfehlungen der CDC oder des NCCLS bezüglich Blutentnahme zu beachten.^{6,7}

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen (s. "Lieferbare Produkte").

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger, Kanüle mit Spritze (oder geeignetes Blutentnahmebesteck), Isopropyl- oder Äthylalkohol (70 %), Jodlösung (2 %), Brutschrank (35 ± 2 °C), sterile Entlüftungseinheiten (s. "Lieferbare Produkte"), Inversionsständer (s. "Lieferbare Produkte"), absorbierende Unterlage zur Einwegverwendung, **BACTEC FOS**-Supplement, **BBL IsoVitaleX**-Anreicherungsmedium und Autoklav.

Durchführung des Tests:

- Die entsprechende Kulturflasche vorbereiten und beschriften.
- DEN DECKEL NICHT ABSCHRAUBEN. Den Schutz auf dem Schraubdeckel der Kulturflasche entfernen.
- Die Oberfläche des Gummistöpsels mit Isopropyl- oder Äthylalkohol (70 %) desinfizieren und trocknen lassen.
- Mittels einer Kanüle mit Spritze oder eines Blutentnahmebestecks pro Flasche etwa 8 – 10 mL Patientenblut entnehmen.
- Das Blut sofort unter aseptischen Bedingungen in die Kulturflasche überführen. Inhalt der Flasche durch mehrmaliges Umdrehen mischen.
- Bei Verwendung des BBL SEPTI-CHEK Agarträgers (empfohlen) wie folgt vorgehen:**
Sämtliche Schritte müssen unter aseptischer Arbeitsweise erfolgen. Es wird empfohlen, diese Schritte in einem biologischen Sicherheitsschrank (Sicherheitsstufe II) durchzuführen.

Nach Inkubation der inokulierten Blutkulturflasche für 4 – 6 h bei 35 ± 2 °C:

- Einen **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger vorbereiten und beschriften; Etikett so anbringen, daß die Agaroberflächen sichtbar bleiben.
- Deckel der **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen abschrauben.
- Den unbeschrifteten Deckel des **BBL SEPTI-CHEK** Agarträgers abschrauben und die Agarträger-Einheit auf das Gewinde der Kulturflasche schrauben. NUR VON HAND FESTSCHRAUBEN. ÜBERPRÜFEN, DASS DER DECKEL DES AGARTRÄGERS FEST ANGEBRACHT IST. Flaschen mit Agarträgern können in einen Inversionsständer gesetzt werden (s. "Anleitungen zum Inversionsständer mit 70-ml-Kulturflaschen").
- Das gesamte System (Kombination von Flasche und Agarträger) kippen und 180° um die Längsachse drehen, um ein vollständiges Benetzen der Agaroberfläche zu ermöglichen. SYSTEM NICHT LÄNGER ALS 15 SEK UMGEDREHT HALTEN UND NICHT SCHÜTTELN. DAS SYSTEM AUCH NICHT UMGEDREHT AUF DIE ARBEITSFLÄCHE LEGEN. Das System danach wieder in eine aufrechte Lage bringen. (Träger oben, Flasche unten).
- System 18 – 24 h bei 35 ± 2 °C inkubieren.
- Wenn der **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger NICHT verwendet wird, muß die Kulturflasche mit Hilfe einer sterilen Entlüftungseinheit vor der Inkubation bei 35 ± 2 °C vorübergehend entlüftet werden. Dazu vorgehen, wie im nachfolgenden Abschnitt "Entlüftung" beschrieben. Nach dem Entlüften den Inhalt der Flasche durch zwei- oder dreimaliges, vorsichtiges Umdrehen mischen, wofür ein Inversionsständer verwendet werden kann (s. "Anleitungen zum Inversionsständer mit 70-ml-Kulturflaschen").

Anleitungen zum Inversionsständer für 70-ml-Kulturflaschen: Der Ständer kann bis zu 12 Kulturflaschen mit oder ohne **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger aufnehmen. Der Kulturflaschenhalter des Ständers wird durch eine Drehbewegung hoch- und runtergeschoben.

- Den Ständer auf die Arbeitsfläche stellen (mit dem Scharnierstück auf der oberen Position).
- Das Scharnierstück am nicht eingehackten Ende des Rahmens fassen und hochziehen, wenn nötig mit Gewalt.
- Jede Kulturflasche in einen Platzhalter stellen.
- Das Scharnierstück über die Kulturflaschen ziehen und runterdrücken, wenn nötig mit Gewalt, bis des Scharnierstück vollkommen eingehackt und am anderen Ende des Ständers befestigt ist.
- Ständer wie oben beschrieben umdrehen.

Subkultivierung mit dem BBL SEPTI-CHEK Agarträger:

- Nach 18 – 24-stündiger Inkubation die Agaroberfläche des Agarträgers von außen auf Anzeichen von Wachstum untersuchen (s. "Ergebnisse und Auswertung"). Ist die Transparenz des Agarträgers durch kondensierendes Wasser beeinträchtigt, Agarträger, wie in Abschnitt D beschrieben, aus dem Röhren vorsichtig entfernen:

HINWEIS: ES IST DARAUF ZU ACHTEN, DASS KOLONIEN VON MIKROORGANISMEN NICHT MIT KÜGELCHEN DES KUNSTHARZES VERWECHSELT WERDEN, DIE SICHER AUF DEN AGARBERFLÄCHEN ABSETZEN KÖNNEN.

- Wenn kein Wachstum anschließend gefunden hat, ist das Umkippen und Umdrehen des Systems zur Benetzung der Agaroberfläche mit anschließender Inkubation täglich für 7 Tage zu wiederholen. Die Agarflächen dürfen nur einmal am Tag benetzt werden. So-bald sich auf dem Agar Kolonien gebildet haben, wird das weitere Umdrehen des Systems nicht empfohlen.
- Wenn das Wachstum auf irgendeiner der Agaroberflächen konfluierend, verschmiert oder gemischt erscheint, sollte eine Subkultur angelegt werden

Aseptische Arbeitsweise anwenden, vorzugsweise in einem biologischen Sicherheitsschrank der Sicherheitsstufe II. Es wird empfohlen, die folgenden Schritte über einem mit Kunststoffolie überzogenen Fließpapier oder einer ähnlichen Unterlage durchzuführen, um Kunstharzkügelchen aufzufangen, die möglicherweise während des Verfahrens herausfallen. Nach Abschluß der Subkultivierung das Fließpapier oder die Unterlage als infektiösen Abfall entsorgen.

- D. Den mit buntem Etikett versehenen Deckel des Agarträgers vorsichtig abschrauben und die Agarschale herausnehmen. Die Schale am roten Deckel festhalten, ohne die Agarflächen zu berühren und mit einer Impföse ausreichend Koloniematerial entfernen, um Verfahren zur Subkultivierung, Identifizierung und Empfindlichkeitsprüfung der Isolate durchzuführen zu können, wie im Abschnitt "Ergebnisse und Auswertung" beschrieben. Alternativ kann die Inkubationsschale umgedreht, und zusammen mit der beschrifteten Kappe auf den Arbeitstisch gestellt werden. Nach dem Anlegen einer Subkultur Inkubationsschale wieder in das Röhrchen setzen, schließen und von Hand festschrauben.
- E. Wenn nach dem Herausnehmen der Agarschale kein mikrobielles Wachstum beobachtet wird, kann die Schale vorsichtig wieder in die Kammer eingesetzt und das System nach Inversion zur Benetzung der Agaroberflächen erneut inkubiert werden.

HINWEIS: **Darauf achten, daß sich keine Kunstharzkügelchen im Gewinde des Deckels befinden, da die den Agarträger enthaltende Kammer sonst möglicherweise während des nachfolgenden Umdrehens undicht werden könnte. Jegliche Kunstharzkügelchen, die sich im Gewinde des Deckels befinden, aseptisch entfernen, bevor der Agarträger wieder in die Kammer eingesetzt wird.**

Subkultivierung gemäß konventionellen Methoden: Die Kulturflasche nach der Inokulation und Inkubation täglich auf Trübheit, Hämolyse, Gasbildung, Farbänderungen und andere Anzeichen mikrobiellen Wachstums überprüfen. Wenn Wachstum nachgewiesen wird und es ist KEIN **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger angebracht, muß die Flasche vor der Subkultivierung entlüftet werden, um das Gas abzulassen, das sich oft als Folge des bakteriellen Stoffwechsels bildet. Nach der Entlüftung sollte eine Gram-Färbung durchgeführt und eine geeignete Subkultur angelegt werden.

Entlüftung: Das Entlüften sollte in einem biologischen Sicherheitsschrank durchgeführt werden. Soweit möglich und angemessen, ist Schutzkleidung zu tragen. Die Flasche in eine aufrechte Lage bringen und das Septum mit einem Alkoholtupfer abdecken. Alkoholtupfer und Septum mit einer sterilen Kanüle mit passendem Filter oder kleiner Kompressen durchstechen. Das Einstechen und Zurückziehen der Kanüle sollte mit einer geradlinigen Bewegung ohne Drehungen erfolgen. Die Kanüle in einem punktionssicheren Abfallbehälter entsorgen.

Qualitätskontrolle:

BBL SEPTI-CHEK Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen: Die nachstehend vorgeschlagenen Mikroorganismen können zur Qualitätskontrolle verwendet werden: *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) und *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Die Bouillon mit einem bakteriellen Inokulum von etwa 300 KBE/ml beimpfen. Flaschen mit Hilfe einer sterilen Entlüftungseinheit entlüften (s. "Entlüftung") und bei 35 ± 2 °C inkubieren. Flaschen auf Anzeichen mikrobiellen Wachstums überprüfen. Jeden Organismus, der innerhalb von fünf (5) Tagen kein Wachstum aufweist, erneut testen. Sollte dieser Test ebenfalls kein Wachstum aufweisen, bitte einen Becton Dickinson Vertreter verständigen.

BBL SEPTI-CHEK Agarträger: Zur Qualitätskontrolle des Agarträgers einen Agarträger mit Schokoladenagar oder TSA-Agar mit 5 % Schafblut mit den Teststämmen inokulieren. 18 – 24 h in einer aeroben, mit CO₂ angereicherten Atmosphäre bei 35 ± 2 °C inkubieren. Unter Verwendung von TSA-Bouillon serielle Verdünnungen von Teststämmen vorbereiten. **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit einem bakteriellen Inokulum mit einer Dichte von 500 – 1000 KBE/ml beimpfen. Vorsichtig mischen. Einen **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger auf die Kulturflasche schrauben. Das System kippen, um den ganzen Agarträger zu inokulieren. Das System umdrehen und für 24 h inkubieren. Nach der Inkubation sollten die folgenden Testorganismen auf dem Agarträger sichtbares Wachstum aufweisen:

Mikroorganismus	Agar 1	Agar 2	Agar 3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Wachstum	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	Wachstum	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Wachstum	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Wachstum	Wachstum	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Wachstum	—	Wachstum

*Die Erkennung von Wachstum kann 48 h erfordern.

Alle für die Qualitätskontrolle verwendeten Einheiten ordnungsgemäß entsorgen.

ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG

Falls Bakterienwachstum stattfindet, kann es in der Regel innerhalb von 48 h nachgewiesen werden; Kulturen sollten jedoch mindestens 7 Tage lang inkubiert werden, bevor ein negativer bakteriologischer Befund gemeldet wird. Wenn ein **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger NICHT verwendet wird, muß die Anwesenheit von Mikroorganismen zusätzlich durch Subkultivierung auf geeigneten Medien und durch angemessene Identifizierungsverfahren bestätigt werden.

Bei Verwendung eines **BBL SEPTI-CHEK** Agarträgers ist Wachstum auf den Agaroberflächen gewöhnlich zu erkennen, wenn der Organismus in der Blutkultur eine Dichte von etwa 500 KBE/ml erreicht. Wenn die Konzentration des Organismus zum Zeitpunkt der ersten Subkultur des Agarträgers (Kippen des Systems) größer ist als 10⁸ KBE/ml, ist das Wachstum auf dem Agarträger möglicherweise konfluierend. Die typische Koloniemorphologie ist bei konfluierendem Wachstum nicht zu erkennen, da dieses als dünner Film auf der Agaroberfläche erscheinen kann.

Die drei verschiedenen, im Agarträger vorhandenen Medien können in vielen Fällen eine vorläufige Differenzierung der Isolate ermöglichen, vorausgesetzt die Probe ist eine Reinkultur.

Agar 1 (Schokoladenagar) ist ein optimales Medium zur Isolierung eines breiten Spektrums von Mikroorganismen, einschließlich gram-negativer und gram-positiver Bakterien, anspruchsvoller Bakterien wie z.B. *Neisseria* und *Haemophilus* spp., sowie von Hefen.

Agar 2 (MacConkey-Agar) ist ein selektives Differenzierungsmedium für *Enterobacteriaceae* und bestimmte nichtfermentierende Organismen wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*. Gram-positive Bakterien werden gehemmt.

Agar 3 (Malzagar) ist ein selektives Medium für Pilze und Hefen. Bakterienwachstum wird gewöhnlich gehemmt.

Eine abschließende Subkultur der Bouillon auf Schokoladenagar und eine 2-tägige Inkubation können durchgeführt werden, um geringes Wachstum auf dem Agarträger zu bestätigen oder ein ungewöhnliches Aussehen der Bouillon zu untersuchen; dies ist jedoch nicht erforderlich.

Vom Wachstum auf den Agarträgern sind Subkulturen auf geeigneten Medien anzulegen, z.B. auf Schokoladenagar und TSA-Agar mit 5 % Schafblut, die in einer aeroben, mit CO₂ angereicherten Atmosphäre inkubiert werden. Ein Ausstrich mit nachfolgender Gram-Färbung und mikroskopischer Untersuchung kann direkt vom Wachstum auf der Oberfläche der Agarmedien angefertigt werden. Eine mikroskopische Untersuchung wird ebenfalls empfohlen, um das Vorliegen einer Reinkultur zu garantieren. Geeignete Identifizierungstests und normalerweise eine Empfindlichkeitsprüfung der Isolate sollten durchgeführt werden.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Um eine Septikämie mit hinreichender Genauigkeit erfassen zu können, ist es erforderlich, 1 – 3 Paare Blutkulturen (aerob und anaerob) zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten anzulegen. Keine einzelne Kultur kann die Anwesenheit von Mikroorganismen in Blut ausschließen.

Antimikrobielle Therapie vor der Blutentnahme, transitorische Bakteriämie, Kontamination des Blutes durch exogene Flora oder Kontamination des Blutkulturflaschenmediums beim Anbringen des Agarträgers sind Faktoren, die das Wachstum klinisch relevanter Mikroorganismen in der Bouillon und auf dem Agarträger beeinflussen. Mikroaerophile Organismen können im Flüssigmedium der Kulturflasche Wachstum aufweisen, während auf der Agarträgeroberfläche kein Wachstum sichtbar ist. Werden im Flaschenmedium Trübung, Hämolyse oder andere Anzeichen bakteriellen Wachstums beobachtet, aber wird im Medium auf der Inkubationsschale der Organismus nach Kippen und Reinkubation des Systems nicht isoliert, sollten Subkulturen von dem Kulturflaschenmedium angelegt und der Subkulturträger in einer angemessenen Gasatmosphäre (wie z.B. vom **BBL CampyPak**-System (s. "Lieferbare Produkte") erhältlich) inkubiert werden. Rein anaerobe Organismen werden ebenfalls kein Wachstum auf den Agarträgeroberflächen aufweisen. Im Flüssigmedium können diese jedoch in seltenen Fällen Wachstum aufweisen.

NPS hemmt das Wachstum bestimmter Mykoplasmen und das **BBL SEPTI-CHEK** Blutkultursystem sollte zur deren Isolierung nicht verwendet werden.⁹

Die Neutralisation der antimikrobiellen Aktivität durch Kunstharze variiert mit der Dosis und dem Zeitpunkt der Probenentnahme. Hinweise zur Neutralisation von antimikrobiellen Agenzien durch Kunstharze können von Ihrem Becton Dickinson Vertreter erhalten werden.

Kulturmedien enthalten mitunter eine kleine Anzahl nicht lebensfähiger, aus Mediumbestandteilen stammender Organismen, die in Ausstrichen von nicht inokulierten Blutkulturmedien sichtbar sein können. Andere Quellen nicht lebensfähiger Organismen, die bei einer Gram-Färbung sichtbar werden, sind Färbungsreagenzien, Immersionsöle, Glasplatten und die zur Inokulation verwendeten Proben. Falls bezüglich der Gültigkeit der Gram-Färbung Zweifel vorliegen, sollte vor Ausstellen eines Berichts die Kultur erneut für eine oder zwei Stunden inkubiert und das Ausstrich- und Färbungsverfahren wiederholt werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Die gemeinsame Verwendung der **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen und des **BBL SEPTI-CHEK** Agarträgers ermöglicht die Isolierung von aeroben und fakultativen Mikroorganismen.

Untersuchungen mit beimpften Kulturen wurden mit Inokulumdichten von 10 – 100 KBE pro Flasche durchgeführt. Es folgt eine Aufstellung der Organismen, die in einer **BBL SEPTI-CHEK** Kulturflasche mit TSB und Kunstharzen und dem an ihr angebrachten **BBL SEPTI-CHEK** Agarträger innerhalb von fünf (5) Tagen Wachstum aufwiesen.

<i>Acinetobacter anitratus</i> ATCC 33498	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ** ATCC 43069
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	<i>Neisseria meningitidis</i> ** ATCC 13090
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 10211	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 19418	<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC 13637
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	

*Unter Zugabe von **BBL IsoVital**X-Anreicherungsmedium

Unter Zugabe von 3,5 mL frischem Blut oder **BACTEC FOS-Supplement

Interne Studien† haben gezeigt, daß antimikrobielle Agenzien von Kunstharzen neutralisiert werden, die im **BACTEC**-Kunstharzmedium verwendet werden. In diesen Tests wurden antimikrobielle Agenzien in klinisch relevanten Konzentrationen vor der Inokulation mit empfindlichen Stämmen direkt dem Kunstharzmedium zugegeben. Diese Tests wurden gleichzeitig mit nicht-Kunstharzmedien als Kontrolle ausgeführt. Penicilline, Cephalosporine (erste, zweite und dritte Generation), Makrolide, Aminoglykoside, Fluorchinolone, Lincomycine, Tetracycline und Chloramphenicol sind Beispiele von antimikrobiellen Agenzien, die von Kunstharzen neutralisiert werden.

†Unterlagen liegen vor bei Becton Dickinson Microbiology Systems.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
243189	BBL SEPTI-CHEK TSB (Trypticase -Soja-Bouillon) mit Kunstharzen, Kulturflaschen, 10 x 70 mL.
243181	BBL SEPTI-CHEK Agarträger (Schokoladenagar, MacConkey-Agar und Malzagar), Blutkultur/Subkultur-Agarträger, 10 Agrträger.
243500	BBL SEPTI-CHEK Agarträger (Schokoladenagar, MacConkey-Agar und Malzagar), Blutkultur/Subkultur-Agarträger, 50 Agarträger.
243563	BBL SEPTI-CHEK Adapter zur Blutentnahme, Packung à 50.
243247	Inversionsständer, Kulturflasche, 70 mL, Packung à 1.
271056	Sub/Entlüftungseinheiten für Kulturflaschen, Packung à 100.

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
USA

88-0945-1
Rivisto: 05-99

ITALIANO

BBL SEPTI-CHEK

Flacone per emocoltura resinato

Da utilizzare per la coltura di microrganismi

USO PREVISTO

Test qualitativo per il rilevamento di microrganismi aerobi e facoltativi (batteri e lieviti) nel sangue.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

L'emocoltura è una delle procedure più importanti e critiche utilizzate nei laboratori di microbiologia. Poiché il sangue è di norma sterile, l'isolamento e l'identificazione di un organismo assumono un notevole significato diagnostico. Le emocolture sono di grande importanza nella diagnosi di condizioni patologiche quali endocardite, febbre tifoidea, polmonite e altre malattie caratterizzate da batteremia.

È stato dimostrato che l'uso di un sistema per emocoltura bifasico migliora il grado di sensibilità rispetto alle brodculture tradizionali.¹⁻³ Mentre a contatto con i flaconi per emocoltura **BBL SEPTI-CHEK**, dopo l'inoculo con sangue le superfici dell'agar presenti sullo slide consentono la subcoltura dei microrganismi aerobi, facoltativi e capnofili presenti nel campione, dopo che il flacone, con il vetrino attaccato, viene inclinato e incubato nuovamente. È accertato che la presenza di resine nei brodi di coltura contribuisce in modo significativo a un recupero più elevato di patogeni clinici dai campioni.^{4,5} Questo aumento è più alto nei campioni che contengono antibiotici, ma si sono verificati aumenti di recupero significativi anche da campioni privi di antibiotico. Il flacone per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinato, quando usato insieme allo Slide **BBL SEPTI-CHEK**, combina le caratteristiche dei due, con l'effetto di diventare uno strumento valido per l'isolamento di batteri sia in presenza che in assenza di un'ampia varietà di antibiotici (vedere "Caratteristiche di Performance"). La presenza sul vetrino di terreni agarici differenziali, di tipo sia selettivo che non selettivo, permette una predifferenziazione dei microrganismi presenti nel liquido di coltura contenuto nel flacone.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il sangue viene prelevato mediante endovena e trasferito in condizioni sterili in un flacone per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinato. Per un recupero ottimale, si avvia lo Slide **BBL SEPTI-CHEK** e si mescola per inversione del sistema (flacone e slide) 4 - 6 h dopo l'inoculo. L'unità slide/flacone viene incubata senza agitazione a 35 ± 2° C per un periodo di 7 giorni. Lo slide viene ispezionato giornalmente per verificare la crescita e periodicamente bagnato per inversione del sistema (flacone e slide). I flaconi per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinati vanno usati per il recupero di organismi in presenza di ossigeno e non sono raccomandati per l'uso in colture anaerobiche. Se i flaconi per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinati vengono usati senza lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**, essi vanno leggermente ventilati dopo l'inoculo per mezzo di un'unità di ventilazione sterile (vedere "Disponibilità").

REAGENTI

Flaconi per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinati

Formula approssimata* per L

TSB (Brodo di Soia **Trypticase**) resinato - 70 mL.

Acqua deionizzata	1,00 L	Destrosio	0,6 g
Resina assorbente non ionica	64,0 g	Sodio polianetol sulfonato (SPS)	0,50
Brodo di estratto di caseina di soia	27,5	Piridossale HCl (Vitamina B6)	0,01
Resina a scambio cationico	4,0	Emina	0,005
Estratto di lievito	2,5	Menadione	0,0005
Saccarosio	0,8		

*Controllata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

Ogni flacone di coltura contiene CO₂ ad un'atmosfera.

Precauzioni: Diagnostica *in vitro*

L'SPS inibisce la crescita di certi micoplasmi e non deve perciò essere usato per il loro isolamento.

Un certo numero di organismi fastidiosi e/o sensibili al sodio polianetol sulfonato può non crescere in terreni senza sangue o privi di un supplemento adeguato, come il **BACTEC FOS** (Fastidious Organism Supplement) (vedere "Disponibilità"), o il supplemento **BBL IsoVitaleX** (vedere "Disponibilità"). Esempi di tali organismi sono *H. influenzae*, *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*.

Non usare flaconi che presentano incrinature o difetti.

I flaconi per coltura inoculati vanno decontaminati prima di essere eliminati.

Osservare una tecnica asettica e usare le opportune precauzioni contro i pericoli microbiologici, compreso l'uso dei guanti, durante tutti i procedimenti. Tutti i campioni dovrebbero essere trattati secondo le raccomandazioni dei CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), le direttive NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), o le norme interne di laboratorio, per quanto riguarda siero umano, sangue o altri fluidi biologici potenzialmente infetti. Prima di essere eliminati, i contenitori con i campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave.

Conservazione: Conservare i flaconi per coltura a 15 - 25° C. Proteggere dalla luce.

Indicazioni fisiche di instabilità: Le indicazioni di deterioramento di un flacone non inoculato sono rappresentate dallo sviluppo di torbidità e/o da alterazioni di colore. Non usare oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone.

Slide **BBL SEPTI-CHEK:** Formula approssimata* per L di acqua deionizzata

Agar 1: Agar Cioccolato	Agar 2: Agar MacConkey	Agar 3: Agar Malto
Base agar GC	Peptoni	Estratto di malto.....
Emoglobina in polvere.....	Agar	Agar.....
Supplemento BBL IsoVitaleX	Lattosio.....	
Agar cristallizzato	Cloruro di sodio.....	
	Sali biliari	
	Rosso neutro	
	Cristal violetto.....	

*Controllata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

Conservazione: Conservare gli slides a 2 - 8° C. Proteggere dalla luce; evitare sbalzi di temperatura durante il periodo di conservazione, in quanto ciò potrebbe causare eccessiva condensa nella provetta dello slide.

Indicazioni fisiche di instabilità: Se al momento dell'ispezione degli slides non inoculati (ancora sigillati) si riscontra la presenza di colonie sulle superfici dell'agar o all'interno di esso, ciò è indicazione di contaminazione. Altri segni di deterioramento sono: superfici di agar contratte, agar separato dal vassoio, forti differenze di colore tra le superfici dell'agar. Gli slides che esibiscono caratteristiche tra quelle menzionate non vanno usati e devono essere opportunamente eliminati. Non usare oltre la data di scadenza.

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Le resine presenti nei flaconi per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinati sono in grado di neutralizzare un'ampia varietà di antibiotici, eventualmente presenti in concentrazioni clinicamente significative (vedere "Caratteristiche di Performance"). Per ottenere risultati ottimali, comunque, il prelievo del sangue dovrebbe essere fatto prima di iniziare la terapia antibiotica. Se ciò non è possibile, il prelievo deve venir fatto immediatamente prima di somministrare la dose successiva.

Per poter rilevare la setticemia con sufficiente accuratezza, può essere necessario eseguire da una a tre emocolture a intervalli di tempo stabiliti, in rapporto alla situazione clinica.

Preparazione della cute: Al fine di evitare la possibilità di emocolture false positive (p. es. con *Staphylococcus epidermidis*), la zona di cute deve essere pulita accuratamente e disinfettata. Pulire la cute con un tampone imbevuto di alcol isopropilico o etilico al 70% e disinfettare con una soluzione di iodio al 2%. Lasciar asciugare la cute prima del prelievo. La zona di cute, una volta disinfettata, non deve essere toccata al fine di evitare una nuova contaminazione. Dopo il prelievo deve essere rimosso ogni residuo di iodio.

Prelievo del sangue: Impiegando ago e siringa, o l'adattatore per il prelievo **BBL SEPTI-CHEK** (vedere "Disponibilità"), prelevare circa 8 - 10 mL di sangue dal paziente per ogni flacone per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinato da 70 mL. In considerazione del rischio di contrarre malattie infettive, si prega di consultare le raccomandazioni dei CDC o dell'NCCLS sul prelievo del sangue.^{6,7}

PROCEDURA

Materiali forniti: Flaconi per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinati (vedere "Disponibilità").

Materiali non forniti: Slides **BBL SEPTI-CHEK**, ago e siringa (o set per il prelievo del sangue), alcol isopropilico o etilico (70%), soluzione di iodio (2%), incubatore (35 ± 2° C), unità di ventilazione sterili (vedere "Disponibilità"), rack per inversione (vedere "Disponibilità"), tamponi assorbenti monouso, supplemento **BACTEC FOS**, supplemento **BBL IsoVitaleX** e autoclave.

Esecuzione del test:

- Preparare ed etichettare il flacone per coltura.
- NON SVITARE IL TAPPO DEL FLACONE. Togliere il cappuccio protettivo del tappo a vite dal flacone per coltura.
- Disinfettare la parte visibile del tappo di gomma con alcol isopropilico o etilico (70%) e lasciar asciugare.
- Prelevare circa 8 - 10 mL di sangue dal paziente per ogni flacone, utilizzando ago e siringa o un set per prelievo.
- Trasferire immediatamente il sangue nel flacone di coltura, osservando la sterilità. Mescolare con delicatezza capovolgendo ripetutamente.

Se si usa lo Slide **BBL SEPTI-CHEK** (uso raccomandato), utilizzare la seguente procedura:

Osservare la sterilità in ogni momento. Si raccomanda di eseguire ogni operazione in una cella di sicurezza biologica (classe II).

Incubare il flacone per emocoltura inoculato per 4 - 6 h a 35 ± 2° C, quindi:

- Preparare ed etichettare uno Slide **BBL SEPTI-CHEK**; apporre l'etichetta in modo tale che le superfici dell'agar rimangano visibili.
 - Svitare il tappo del flacone per coltura **BBL SEPTI-CHEK** TSB resinato.
 - Svitare il tappo dello Slide **BBL SEPTI-CHEK** e avvitare lo slide al flacone di coltura. CHIUDERE STRIN- GENDO SOLO CON LE DITA. ASSICURARSI CHE IL TAPPO DELLO SLIDE SIA BEN FISSO. Se si desidera, collocare i flaconi con gli slide in un rack per inversione (vedere "Istruzioni per l'uso del rack da inversione per flaconi da 70 mL").
 - Capovolgere l'intero sistema (combinazione flacone-slide) facendolo ruotare di 180° sull'asse longitudinale per permettere la saturazione completa delle superfici dell'agar. NON TENERE IL SISTEMA CAPOVOLTO PER PIÙ DI 15 SEC E NON AGITARE. NON PORRE IL SISTEMA COSÌ CAPOVOLTO SUL PIANO DI LAVARO. Riportare in posizione eretta (slide sopra, flacone sotto).
 - Incubare il sistema per 18 - 24 h a 35 ± 2° C.
7. **Se NON si usa lo Slide **BBL SEPTI-CHEK****, il flacone di coltura deve essere leggermente ventilato, usando un'unità di ventilazione sterile, prima di venir incubato a 35 ± 2° C. Seguire la procedura di ventilazione descritta più avanti nel paragrafo "Ventilazione". Dopo che il flacone è stato ventilato, mescolare il contenuto due o tre volte capovolgendo delicatamente, o usando, se si desidera, un rack per inversione (vedere "Istruzioni per l'uso del rack da inversione per flaconi da 70 mL").

Istruzioni per l'uso del rack da inversione per flaconi da 70 mL: Il rack può contenere fino a 12 flaconi con o senza Slide **BBL SEPTI-CHEK**. La parte del rack che tiene fermi i flaconi si alza e si abbassa, grazie a un perno.

- Porre il rack sul piano di lavoro, con la parte mobile sul lato superiore.
- Afferrare la parte mobile dal lato opposto del perno ed alzare, facendo forza se necessario.
- Collocare i flaconi, uno dopo l'altro, dentro ai singoli compartimenti.
- Abbassare la parte mobile sui flaconi e spingere giù, facendo forza se necessario, fino a chiusura completa ed ermetica della parte mobile del rack.
- Capovolgere il rack come descritto sopra.

Subcoltura utilizzando lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**:

- Dopo 18 - 24 h di incubazione, controllare dall'esterno la crescita sulle superfici di agar dello slide (vedere "Risultati e Interpretazione"). Se delle gocce di condensa impediscono la trasparenza dello slide, togliere lo slide dalla provetta, con la dovuta attenzione, come indicato al paragrafo D.

NOTA: SI DEVE FARE ATTENZIONE A NON CONFONDERE LE COLONIE DI MICRORGANISMI CON I GRANELLI DI RESINA CHE SI POSSONO DEPOSITARE SULLE SUPERFICI DELL'AGAR.

- Se non si è verificata alcuna crescita, capovolgere nuovamente il sistema per bagnare la superficie dell'agar, quindi reincubare. Ripetere questo procedimento una volta al giorno per 7 giorni. Non bagnare le superfici dell'agar più di una volta al giorno. Una volta formatesi le colonie sulle superfici dell'agar, si raccomanda di non capovolgere più il sistema.
- Se si nota crescita confluyente, mista o senza contorni chiari, è necessario eseguire una subcoltura.

Usare tecniche asettiche e seguire preferibilmente in una cella di sicurezza biologica, classe II. Si raccomanda di effettuare la procedura seguente sopra un foglio di carta assorbente con fondo di plastica, per contenere l'eventuale fuoriuscita di granelli di resina durante la procedura. A completamento della subcoltura, eliminare il foglio di carta assorbente nei rifiuti a rischio biologico.

- Svitare con prudenza il tappo (con etichetta colorata) dello slide e togliere il vassoio di incubazione con l'agar. Senza toccare la superficie dell'agar, tenere il vassoio per il tappo con etichetta colorata e, facendo uso di un'ansa da inoculo, prelevare una quantità sufficiente di colonie per poter eseguire le necessarie operazioni di subcoltura, identificazione e test di sensibilità dell'isolato (o isolati), come descritto in "Risultati e Interpretazione". Come alternativa, si può invertire il vassoio e porre il tappo con l'etichetta contro il piano di lavoro. Dopo la subcoltura, rimettere il vassoio nella provetta e chiudere stringendo con il dita.

E. Se, dopo aver tolto il vassoio con l'agar, non si riscontra alcuna crescita microbica, si può rimettere il vassoio nella cella con la dovuta attenzione e reincubare il sistema, dopo averlo capovolto per bagnare le superfici dell'agar.

NOTA: **Controllare che non vi siano granelli di resina nella parte a vite del tappo, poiché ciò può causare fuoriuscita di liquido quando si effettua il capovolgimento per bagnare le superfici dell'agar. Rimuovere in modo asettico ogni eventuale granello di resina presente nella parte a vite del tappo prima di reincubare il vassoio.**

Subcoltura utilizzando i metodi convenzionali: Dopo l'inoculo e l'incubazione del flacone, osservare quotidianamente eventuali segni di torbidità, emolisi, formazione di gas, cambiamenti di colore e altri segni di crescita microbica. Se si rileva crescita e lo Slide **BBL SEPTI-CHEK NON** è avvitato, è necessario ventilare il flacone prima della subcoltura, per dar sfogo al gas che spesso si accumula in seguito a metabolismo microbico. Dopo la ventilazione, eseguire un vetrino colorato con Gram, poi la subcoltura idonea.

Ventilazione: La ventilazione deve essere effettuata in una cella di sicurezza biologica. Se possibile ed opportuno, indossare indumenti protettivi. Porre il flacone in posizione verticale e collocare un tampone imbevuto d'alcol sul diaframma. Inserire un ago sterile con un appropriato filtro o compressa attraverso tampone e diaframma di gomma. L'inserimento e la rimozione dell'ago devono essere eseguiti con movimento lineare, evitando torsioni. Eliminare l'ago in un contenitore apposito per oggetti taglienti.

Controllo di qualità:

Flacone per coltura BBL SEPTI-CHEK TSB resinato: Possono essere impiegati i seguenti ceppi per il controllo di qualità: *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Inoculare il brodo con una carica batterica di circa 300 UFC/ml. Ventilare i flaconi con un'unità di ventilazione sterile (vedere "Ventilazione") e incubare a 35 ± 2° C. Osservare i segni di crescita microbica nel flacone. Ripetere la prova per ogni organismo che non esibisce crescita nel giro di cinque (5) giorni. Se neppure al secondo tentativo non si verifica crescita, contattare il rappresentante locale della Becton Dickinson.

Slide **BBL SEPTI-CHEK:** Per il controllo di qualità dello slide, inoculare una piastra di Agar Cioccolato o TSA con sangue di montone al 5% con i ceppi da testare. Incubare in condizioni aerobiche per 18 - 24 h in atmosfera arricchita con CO₂ a 35 ± 2° C. Se si usa il Brodo TSA, preparare diluizioni seriali dei ceppi da testare. Inoculare un flacone **BBL SEPTI-CHEK** con una carica batterica di 500 - 1000 UFC/ml. Mescolare con cura. Avvitare uno Slide **BBL SEPTI-CHEK** al flacone. Capovolgere il sistema per inoculare lo slide completamente. Rimettere il sistema in posizione eretta e incubare per 24 h. Al termine dell'incubazione, sugli slide si dovrebbe notare la crescita dei seguenti organismi:

Microorganismo	Agar 1	Agar 2	Agar 3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Crescita	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> * ATCC 13090	Crescita	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crescita	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescita	Crescita	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crescita	—	Crescita

*Può richiedere 48 h prima che la crescita sia visibile.

Eliminare in modo adeguato tutto quanto è stato utilizzato per il test di controllo qualità.

RISULTATI E INTERPRETAZIONE

La crescita batterica, qualora presente, diviene di solito evidente entro 48 h. Le colture devono comunque essere incubate per almeno 7 giorni prima che i risultati siano considerati negativi. Se NON si usa lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**, la presenza di microrganismi deve essere ulteriormente confermata dalla subcoltura su terreni adeguati e mediante l'esecuzione di idonee procedure di identificazione.

Se si usa lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**, la crescita sulle superfici dell'agar diviene di solito evidente quando gli organismi in emocoltura hanno raggiunto la concentrazione di circa 500 UFC/ml. Se al momento della prima subcoltura su slide (capovolgimento del sistema) la concentrazione è maggiore di 10⁶ UFC/ml, la crescita sullo slide può assumere aspetto confluyente. In tal caso i dettagli morfologici delle singole colonie vengono persi, dato che i batteri formano una patina uniforme sulla superficie dell'agar.

I tre diversi terreni con agar nello slide consentono in molti casi una pre-differenziazione dell'isolato, purché il campione sia una coltura pura.

Agar 1 (Agar Cioccolato) è un terreno ottimale per il recupero di un'ampia varietà di microrganismi, tra cui i batteri gram-negativi e gram-positivi, organismi esigenti come le specie *Neisseria* e *Haemophilus*, e lieviti.

Agar 2 (Agar MacConkey) è un terreno selettivo differenziale per Enterobacteriaceae e alcuni non-fermentanti come *Pseudomonas aeruginosa*. I batteri gram-positivi non vengono inibiti.

Agar 3 (Agar Malto) è un terreno selettivo per funghi e lieviti. La crescita batterica viene di solito inibita.

In caso di crescita stentata sullo slide, o di aspetto inconsueto del brodo, è possibile effettuare una subcoltura terminale del brodo su Agar Cioccolato e incubarla per 2 giorni: pur raccomandabile, non è obbligatorio.

In ogni caso, la presenza del microorganismo va confermata mediante semina su terreno idoneo, come l'Agar Cioccolato e l'Agar TSA con sangue di montone al 5%, e incubazione in atmosfera aerobica arricchita con CO₂. Si possono eseguire anche un vetrino colorato con Gram e l'esame microscopico diretto della coltura sulla superficie di agar dello slide. L'esame microscopico è raccomandato anche per ottenere conferma che la coltura è pura. Vanno eseguiti test di identificazione idonei e, di solito, anche il test di sensibilità sull'isolato (o isolati).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Per poter rilevare la presenza di setticemia in modo sufficientemente accurato, è necessario il prelievo di 1 - 3 set di emocolture (aerobia e anaerobia) a regolari intervalli di tempo. Nessun singolo procedimento culturale permette di escludere la presenza di microrganismi nel sangue.

Tra i fattori che possono influire sulla crescita di organismi di rilevanza clinica nel brodo e sullo slide, sono da annoverare: la terapia antibiotica prima del prelievo del sangue, batteremie transitorie, contaminazione del sangue da parte di flora esogena o contaminazione del terreno contenuto nel flacone per emocoltura durante l'avvitatura dello slide. Nel liquido di coltura del flacone possono crescere organismi microaerofili, che però possono non avere la capacità di produrre una crescita sufficiente sulle superfici dello slide. Se il terreno dentro al flacone è torbido, se ci sono emolisi o altri segni di crescita microbica, ma i terreni sul vassoio non sono in grado di recuperare l'organismo dopo che il sistema è stato capovolto e incubato di nuovo, subcolturate dal terreno del flacone e incubare la piastra di subcoltura in gas ad atmosfera adeguata (in un sistema **BBL CampyPak**) (vedere "Disponibilità"). Inoltre, gli organismi strettamente anaerobi non crescono sulle superfici di agar dello slide, ma in rari casi possono crescere nel liquido di coltura del flacone.

Il sodio polianetol sulfonato (SPS) inibisce la crescita di alcuni micoplasmi, perciò il sistema per emocoltura **BBL SEPTI-CHEK** non va usato per il loro isolamento.⁸

La neutralizzazione dell'attività antimicrobica da parte delle resine varia a seconda del volume di sangue prelevato e della frequenza o dei tempi delle colture. Per informazioni sugli agenti antimicrobici neutralizzati dalle resine, rivolgersi al rappresentante locale della Becton Dickinson.

I terreni di coltura contengono a volte una piccola quantità di organismi non vivi, derivati da costituenti del terreno, che possono essere visibili nei vetrini di campioni di terreno non inoculato. Altre fonti di organismi non vivi visibili al Gram comprendono reagenti di colorazione, olio di immersione, vetrini e il tipo di campione usato per l'inoculo. Se si è incerti sulla validità della colorazione di Gram, incubare ancora per una o due ore e ripetere il vetrino e la colorazione prima di stendere il referto.

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Il flacone di coltura **BBL SEPTI-CHEK TSB resinato** e lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**, quando usati in combinazione, consentono l'isolamento di microrganismi aerobi e facoltativi.

Sono stati compiuti studi sulla semina di emocolture usando inoculi con carica batterica da 10 - 100 UFC per flacone. La lista seguente indica i ceppi per i quali si è riscontrata crescita nel giro di cinque (5) giorni nel flacone **BBL SEPTI-CHEK TSB resinato** combinato con lo Slide **BBL SEPTI-CHEK**.

<i>Acinetobacter anitratus</i> ATCC 33498	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ** ATCC 43069
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	<i>Neisseria meningitidis</i> ** ATCC 13090
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 10211	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 19418	<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC 13637
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	

*aggiunta del supplemento **BBL IsoVitaleX**

aggiunta di 3,5 mL di sangue fresco o di supplemento **BACTEC FOS

Studi interni[†] hanno dimostrato che gli antibiotici vengono effettivamente neutralizzati dalle resine usate nei terreni **BACTEC** resinati. In questi test gli antibiotici sono stati aggiunti, in concentrazioni clinicamente rilevanti, direttamente ai terreni resinati prima dell'inoculo con ceppi sensibili. Tali test sono stati eseguiti in parallelo usando come controllo dei terreni non resinati. Tra gli agenti antibiotici neutralizzati dalle resine ci sono le penicilline, le cefalosporine, (prima, seconda e terza generazione), i macrolidi, gli aminoglicosidi, i fluorochinoloni, le lincomicine, le tetracicline e il cloranfenicolo.

†Dati in archivio, Becton Dickinson Microbiology Systems.

DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione
243189	BBL SEPTI-CHEK TSB (Brodo di Soia Trypticase), Flacone per coltura resinato, 10 x 70 mL.
243181	BBL SEPTI-CHEK Slide (Agar Cioccolato, Agar MacConkey e Agar Malto), slide per emocoltura e subcoltura, 10 slide.
243500	BBL SEPTI-CHEK Slide (Agar Cioccolato, Agar MacConkey e Agar Malto), slide per emocoltura e subcoltura, 50 slide.
243563	BBL SEPTI-CHEK Adattatore per il prelievo del sangue, con. da 50.
243247	Rack per inversione, flacone da 70 mL, conf. da uno.
271056	Unità di ventilazione/subventilazione per flaconi di coltura, conf. da 100.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
USA

8-0945-1
Revisado: 05-99

ESPAÑOL

BBL SEPTI-CHEK

Frasco de hemocultivo con resinas

Para uso en el cultivo de microorganismos

USO PREVISTO

Prueba cualitativa para la detección de microorganismos aerobios y facultativos (bacterias y levaduras) en la sangre.

RESUMEN Y EXPLICACION

El hemocultivo es uno de los procedimientos esenciales y más importantes que se realizan en los laboratorios de microbiología. Puesto que la sangre es normalmente estéril, el aislamiento y la identificación de un determinado microorganismo tiene un gran significado para el diagnóstico. Los hemocultivos son de gran importancia en el diagnóstico, por ejemplo, de endocarditis, fiebre tifoidea, neumonía y otras enfermedades caracterizadas por bacteriemia.

El uso de un sistema bifásico para hemocultivo ha demostrado un incremento en la sensibilidad del hemocultivo comparado con el sistema tradicional de hemocultivo en medio líquido.¹⁻³ Cuando se combina un Slide con el frasco de hemocultivo **BBL SEPTI-CHEK** después de su inoculación con sangre, las superficies del agar en el Slide permiten el subcultivo de microorganismos aerobios, facultativos y capnofílicos presentes en la muestra mediante la inclinación e incubación adicional del frasco. La presencia de resinas en el medio de hemocultivo ha demostrado producir un incremento significativo en la recuperación de patógenos en muestras clínicas.^{4,5} Dicho incremento en la recuperación es más marcado en muestras que contienen agentes antimicrobianos, pero también han habido aumentos considerables en la recuperación de muestras sin agentes antimicrobianos. El uso conjunto del frasco de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas y el **BBL SEPTI-CHEK** Slide combina ambos aspectos, y ha demostrado ser de utilidad en el aislamiento de bacterias en presencia o ausencia de una amplia variedad de agentes antimicrobianos (vea "Características de rendimiento"). La presencia en el Slide de medios de agar diferenciales no selectivos y selectivos permite hacer una diferenciación preliminar de los microorganismos presentes en el medio líquido del frasco de hemocultivo.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Se toma una muestra de sangre mediante venipuntura y se transfiere en forma aséptica a un frasco de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas. Para obtener una recuperación óptima, el **BBL SEPTI-CHEK** Slide se une al frasco y el sistema (frasco y Slide) se invierte dentro de 4 – 6 h después de la inoculación. La unidad frasco/Slide se incuba sin agitación a 35 ± 2° C durante un período de cultivo de 7 días. El Slide se examina diariamente para observar crecimiento y el sistema (frasco y Slide) se invierte periódicamente. El uso previsto de los frascos de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas es para la recuperación de organismos en presencia de oxígeno, por lo tanto no se recomienda su uso en condiciones anaerobias. Si los frascos para cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas se usan sin el **BBL SEPTI-CHEK** Slide, necesitan una ventilación transitoria después de la inoculación y eso puede hacerse usando un equipo para ventilación estéril (vea "Disponibilidad").

REACTIVOS

Frascos de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas

Fórmula aproximada* por L

TSB (Caldos de soja **Trypticase**) con resinas – 70 mL.

Agua desionizada.....	1,00 L	Dextrosa.....	0,6 g
Resina de absorción no iónica	64,0 g	Polianetosulfonato sódico (SPS).....	0,50
Caldos de digerido de soja-caseína	27,5	Clorhidrato de piridoxal (vitamina B6).....	0,01
Resina de intercambio catiónico.....	4,0	Hemina.....	0,005
Extracto de levadura.....	2,5	Menadiona.....	0,0005
Sacarosa	0,8		

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Cada frasco de cultivo contiene una atmósfera de CO₂.

Precauciones: Diagnóstico *in vitro*

El SPS inhibe el crecimiento de ciertas especies de micoplasmas y, por lo tanto, no deberá utilizarse para su aislamiento.

Es posible que varios organismos exigentes y/o sensibles al SPS no crezcan en medios que no contienen sangre o un suplemento apropiado; por ejemplo, **BACTEC FOS** (Suplemento para organismos exigentes) (vea "Disponibilidad") o Enriquecimiento **BBL IsoVitaleX** (vea "Disponibilidad"). Ejemplos de tales organismos incluyen *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*.

No utilice los frascos que tengan roturas o defectos.

Los frascos de cultivo inoculados se deben descontaminar antes de desecharlos.

Emplee una técnica aséptica y siga las precauciones habituales contra peligros microbiológicos, incluyendo el uso de guantes durante todo el proceso. Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con las recomendaciones de los CDC/NIH (U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health), NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y con las normas locales para suero humano, sangre o cualquier otro líquido corporal potencialmente infeccioso. Los envases de las muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de desecharse.

Conservación: Conserve los frascos de cultivo entre 15 – 25° C. Protéjalos de la luz.

Indicios físicos de inestabilidad: El desarrollo de turbidez y/o cambio de color son indicios de deterioro en un frasco no inoculado. No se utilice después de la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del frasco.

BBL SEPTI-CHEK Slides: Fórmula aproximada* por L de agua desionizada

Agar 1: Agar chocolate	Agar 2: Agar MacConkey	Agar : Agar malta
Base de agar GC.....	Peptonas	Extracto de malta...30,0 g
Hemoglobina en polvo	Agar	Agar.....18,0
Enriquecimiento BBL IsoVitaleX	Lactosa.....	
Agar cristalizado.....	Cloruro de sodio.....	
	Sales biliares	
	Rojo neutro.....	
	Cristal violeta.....	

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Conservación: Conserve los Slides entre 2 – 8° C. Protéjalos de la luz; evite fluctuaciones de temperatura durante la conservación porque se puede provocar una condensación excesiva en el tubo del Slide.

Indicios físicos de inestabilidad: Durante la inspección de los Slides no inoculados (sellados), la presencia de alguna colonia en o sobre la superficie del agar indica contaminación. Las superficies de agar disminuidas o separadas de la bandeja, o diferencias fuertes en el color del agar son indicios de deterioro. Los Slides que muestren alguno de los signos mencionados no deben ser usados y deben desecharse apropiadamente. No utilice después de la fecha de caducidad.

RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las resinas presentes en los frascos de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas son capaces de neutralizar una amplia variedad de agentes antimicrobianos presentes en niveles clínicamente significativos (vea "Características de rendimiento"). Sin embargo, para la obtención de resultados óptimos, las muestras de sangre deberán tomarse antes de iniciar el tratamiento con antibióticos. Si esto no fuera posible, la sangre deberá tomarse inmediatamente antes de administrar la dosis siguiente.

A fin de detectar una septicemia con suficiente precisión, puede ser necesario hacer de uno a tres hemocultivos en distintos momentos predeterminados, dependiendo de la situación clínica.

Preparación de la piel: Para evitar la posibilidad de hemocultivos falsos positivos (por ejemplo, con *Staphylococcus epidermidis*), el lugar donde vaya a efectuarse la venipuntura deberá limpiarse a fondo y desinfectarse. Limpie este sitio con una torunda empapada en alcohol isopropílico o etílico al 70%, y desinfecte con una solución de yodo al 2%. Deje que la piel se seque antes de proceder con la venipuntura. Una vez desinfectado el lugar de la venipuntura, no deberá tocarse otra vez a fin de evitar una nueva contaminación. Después de la venipuntura, deberá eliminarse todo resto de yodo.

Recogida de sangre: Utilizando una aguja y jeringa o un adaptador para la extracción de sangre **BBL SEPTI-CHEK** (vea "Disponibilidad"), extraiga del paciente aproximadamente 8 – 10 mL de sangre cuando utilice el frasco de cultivo de 70 mL **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas. Debido a la preocupación por contraer enfermedades infecciosas, consulte las recomendaciones de los CDC o NCCLS sobre la extracción de sangre.^{6,7}

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Frascos de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas (vea "Disponibilidad").

Materiales no suministrados: **BBL SEPTI-CHEK** Slides, aguja y jeringa (o equipo apropiado para la extracción de sangre), alcohol isopropílico o etílico (70%), solución de yodo (2%), incubadora (35 ± 2° C), unidades para ventilación estériles (vea "Disponibilidad"), gradilla de inversión (vea "Disponibilidad"), toallitas absorbentes desechables, Suplemento **BACTEC FOS**, Enriquecimiento **BBL IsoVitaleX** y autoclave.

Realización de la prueba:

- Prepare y etiquete el frasco de cultivo correspondiente.
- NO DESENROSQUE EL TAPON. Retire la cubierta protectora del tapón de rosca del frasco de cultivo.
- Desinfecte la parte visible del obturador de goma con alcohol isopropílico o etílico (70%) y deje que se seque.
- Extraiga del paciente aproximadamente de 8 – 10 mL de sangre por frasco con una aguja y jeringa o equipo de extracción de sangre.
- Transfiera inmediatamente la sangre al frasco de cultivo, manteniendo las condiciones asépticas; mezcle el contenido suavemente por medio de inversión repetida.
- Si se utiliza el BBL SEPTI-CHEK Slide (cuyo uso se recomienda), haga lo siguiente:**
Trabaje siempre en condiciones de asepsia. Se recomienda que los pasos siguientes se realicen en una cabina de bioseguridad (clase II).
Después de incubar el frasco de hemocultivo inoculado entre 4 – 6 h a 35 ± 2° C:
A. Prepare y etiquete un **BBL SEPTI-CHEK** Slide; pegue la etiqueta procurando no ocultar las superficies de agar.
B. Desenrosque el tapón del frasco de cultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas.
C. Desenrosque el tapón del **BBL SEPTI-CHEK** Slide, introduzca el Slide dentro del frasco de cultivo y enrósquelo. Apriete el tapón solamente con la presión de sus dedos. Asegúrese, que el tapón del Slide esté bien CERRADO. Coloque los frascos con el slide en la gradilla de inversión, si así lo desea (vea "Instrucciones para utilizar la gradilla de inversión de frascos de 70 mL").
D. Incline el sistema completo (la combinación frasco/Slide) y gírelo 180° alrededor del eje longitudinal de manera que el líquido cubra bien la superficie del agar. EL SISTEMA NO DEBE MANTENERSE EN POSICION INVERTIDA DURANTE MAS DE 15 SEG NI AGITARSE. EL SISTEMA TAMPOCO DEBE COLOCARSE EN POSICION INVERTIDA SOBRE LA SUPERFICIE DE LA MESA. Coloque el sistema frasco/Slide en la posición vertical (Slide por arriba, frasco por abajo).
E. Incube el sistema durante 18 – 24 h a 35 ± 2° C.
7. **Si NO se utiliza el BBL SEPTI-CHEK Slide**, el frasco de cultivo debe ventilarse transitoriamente, usando un equipo para ventilación estéril, antes de incubarse a 35 ± 2° C. Siga el procedimiento de ventilación descrito en la sección siguiente de "Ventilación". Después de que el frasco haya sido ventilado, inviértalo lentamente dos o tres veces para mezclar el contenido. Utilice una gradilla de inversión si así lo desea (vea "Instrucciones para utilizar la gradilla de inversión de frascos de 70 mL").

Instrucciones para utilizar la gradilla de inversión de frascos de 70 mL: La gradilla de inversión sostiene hasta 12 frascos con o sin **BBL SEPTI-CHEK** Slides. La pieza de la gradilla que sujeta los frascos sube mediante el movimiento de las bisagras.

- Coloque la gradilla sobre la mesa con la pieza por arriba.
- Sujete el marco de la pieza con bisagras por el extremo de las bisagras y levante con fuerza si es necesario.
- Coloque cada frasco en un compartimento.
- Baje la pieza de bisagras sobre los frascos y empuje hacia abajo, con fuerza si es necesario, hasta que la pieza de bisagras esté bien cerrada y el extremo sin bisagras de la gradilla esté fijo.
- Invierta la gradilla de la manera descrita arriba.

Subcultivos usando el BBL SEPTI-CHEK Slide:

- Después de 18 – 24 h de incubación, inspeccione la superficie del agar del Slide sin sacarlo del frasco en busca de indicios de crecimiento (vea "Resultados e interpretación"). Si la transparencia del Slide está reducida por condensación de agua, saque el Slide del tubo cuidadosamente siguiendo las instrucciones en el párrafo D.

NOTA: TENGA MUCHO CUIDADO DE NO CONFUNDIR LAS COLONIAS DE MICROORGANISMOS CON LOS AGREGADOS DE RESINA QUE PUEDEN DEPOSITARSE EN LA SUPERFICIE DEL AGAR.

- Si no hay crecimiento, antes de volver a incubar el sistema, se debe invertir y revertir una vez al día durante 7 días de manera que el líquido moje la superficie del agar. No moje el agar más de una vez al día. Una vez que las colonias se formen en la superficie del agar, no se recomienda continuar invirtiendo el sistema.
- Si el crecimiento en la superficie del agar es confluyente, difundido o mixto, se debe realizar un subcultivo.

Trabaje en condiciones de asepsia, de preferencia en una cabina de bioseguridad de clase II. Se recomienda que los pasos siguientes se realicen sobre un pedazo de papel absorbente con forro de plástico o de papel acolchonado para contener cualquier residuo de resina que pueda desprenderse durante el procedimiento. Cuando termine el subcultivo, deseche el papel absorbente en un recipiente para material infeccioso.

- Desenrosque con cuidado el tapón con la etiqueta de color del Slide y saque la bandeja con agar. Sin tocar la superficie del agar, sostenga la bandeja por medio del tapón rojo y usando un asa para inoculación tome una porción de la colonia suficiente para realizar apropiadamente los procedimientos de subcultivo, identi-

ficación y pruebas de sensibilidad del (de los) aislado(s), tal como se describe en "Resultados e interpretación". Alternativamente, la bandeja puede invertirse y colocarse con el tapón sobre la superficie de la mesa. Después de hacer los subcultivos, vuelva a introducir la bandeja en el tubo, cierre el tubo y apriete el tapón manualmente.

- E. Si después de sacar la bandeja con agar no se observa crecimiento microbiano, reintrodúzcalo cuidadosamente en el frasco y continúe la incubación del sistema después de invertirlo para mojar la superficie de agar.

NOTA: Asegúrese de que la rosca del tapón no tenga restos de resina porque eso podría causar fugas del recipiente del Slide en inversiones posteriores. Retire asepticamente todo resto de resina de la rosca del tapón antes de devolver el Slide al recipiente.

Subcultivo usando los métodos convencionales: Después de la inoculación e incubación de los frascos de cultivo, inspeccionelos diariamente buscando turbidez, hemólisis, formación de gas, cambio de color y otros indicios de crecimiento. Si se detecta crecimiento y el sistema NO contiene un **BBL SEPTI-CHEK** Slide, será necesario ventilar el frasco antes del subcultivo para liberar el gas que frecuentemente se acumula debido al metabolismo microbiano. Después de ventilar, prepare un frotis para tinción de Gram y utilice los métodos apropiados para subcultivo.

Ventilación: La ventilación debe efectuarse en una cabina de bioseguridad. Si es posible y conveniente, use ropas especiales para protección. Mantenga el frasco en posición vertical y coloque un trozo de algodón empapado en alcohol sobre la membrana del frasco. Con ayuda de un filtro o compresa adecuada, introduzca una aguja estéril a través del trozo de algodón empapado en alcohol y la membrana. La inserción y retirada de la aguja debe realizarse moviendo la mano en línea recta, evitando movimientos giratorios. Deseche la aguja en un recipiente para objetos punzantes.

Control de calidad:

Frasco de cultivo BBL SEPTI-CHEK TSB con resinas: Para las pruebas de control de calidad se sugieren los microorganismos siguientes: *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Inocule el caldo con un inóculo de bacterias que contenga aproximadamente 300 UFC/ml. Ventile los frascos usando un equipo para ventilación estéril (vea "Ventilación") e incube a $35 \pm 2^\circ \text{C}$. Inspeccione los frascos buscando crecimiento microbiano. Vuelva a analizar cualquier organismo que no crece dentro de cinco (5) días. Si el segundo análisis tampoco muestra crecimiento, llame al representante local de Becton Dickinson.

BBL SEPTI-CHEK Slide: Para las pruebas de control de calidad del inóculo agar chocolate o TSA a partir de una placa de sangre de carnero al 5% que contiene las cepas de prueba. Incube aeróbicamente durante 18 a 24 h en una atmósfera enriquecida con CO_2 a $35 \pm 2^\circ \text{C}$. Utilizando caldo TSA, prepare diluciones seriadas de las cepas de prueba. Inocule un frasco **BBL SEPTI-CHEK** con un inóculo bacteriano de 500 a 1000 UFC/ml. Mezcle suavemente. Introduzca un **BBL SEPTI-CHEK** Slide en el frasco. Inclina el sistema para inocular completamente el Slide. Invierta el sistema e incube durante 24 h. Después de la incubación, debiera poder visualizarse en el Slide el crecimiento de los siguientes organismos de prueba:

Microorganismo	Agar 1	Agar 2	Agar 3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Crecimiento	—	—
<i>Neisseria meningitidis</i> * ATCC 13090	Crecimiento	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Crecimiento	—	—
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento	Crecimiento	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crecimiento	—	Crecimiento

*Pueden necesitarse hasta 48 h para un crecimiento visible.

Deseche de forma adecuada todas las unidades utilizadas en las pruebas de control de calidad.

RESULTADOS E INTERPRETACION

Si existe, el crecimiento bacteriano generalmente se hace evidente dentro de 48 h; no obstante, los cultivos deberán incubarse por un mínimo de 7 días antes de informar un resultado como negativo. Si NO se usa un **BBL SEPTI-CHEK** Slide, la presencia de microorganismos deberá ser confirmada nuevamente mediante subcultivos en medios adecuados y mediante la realización de los procedimientos de identificación pertinentes.

Si se usa un **BBL SEPTI-CHEK** Slide, generalmente el crecimiento en la superficie del agar se observa cuando los organismos en el hemocultivo han alcanzado una concentración aproximada de 500 UFC/ml. Si la concentración de organismos en el momento del primer subcultivo del Slide (durante la inclinación del sistema) es más de 10^6 UFC/ml, el crecimiento en el Slide puede ser confluyente. La morfología típica de las colonias no se observa en un crecimiento confluyente, más bien aparece como una película fina sobre la superficie del agar.

El hecho de que el Slide contenga tres medios de agar diferentes en muchos casos permite una diferenciación preliminar del aislado, suponiendo que la muestra es un cultivo puro.

Agar 1 (Agar chocolate) es un medio óptimo para recuperar una amplia gama de microorganismos, incluyendo bacterias gram-negativas y gram-positivas, organismos de crecimiento fastidioso como son *Neisseria* y *Haemophilus* spp., y levaduras.

Agar 2 (Agar MacConkey) es un medio selectivo diferencial para *Enterobacteriaceae* y ciertos organismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias gram-positivas son inhibidas.

Agar 3 (Agar malta) es un medio selectivo para hongos y levaduras. Generalmente inhibe el crecimiento bacteriano.

Para confirmar escaso crecimiento en el Slide o evaluar alguna apariencia rara del caldo, se puede efectuar un subcultivo terminal del caldo en agar chocolate e incubarlo durante 2 días. Sin embargo, esto no es esencial.

El crecimiento en los Slides debe ser subcultivado en los medios apropiados como agar chocolate y agar TSA con 5% sangre de carnero e incubado en una atmósfera aerobia enriquecida con CO_2 . También, se recomienda hacer un frotis para tinción de Gram directamente del crecimiento sobre la superficie del (de los) agar(es) y su observación microscópica, lo que también ayuda a determinar si se trata de un cultivo puro. Se deben efectuar pruebas de identificación apropiadas y, generalmente, también se debe realizar una prueba de sensibilidad del (de los) aislado(s).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A fin de detectar una septicemia con suficiente precisión, es necesario preparar de 1 – 3 pares de hemocultivos (aerobio, anaerobio) a intervalos de tiempo consecutivos. Un solo hemocultivo no es suficiente para descartar la presencia de microorganismos en la sangre.

Los factores que pueden afectar el crecimiento de organismos clínicamente relevantes en el caldo y en el Slide incluyen la terapia antimicrobiana antes de hacer la toma de sangre, la bacteriemia transitoria, la contaminación de la sangre por flora exógena o la contaminación del medio del frasco de hemocultivo durante la colocación del Slide. Los organismos microaerófilos pueden crecer en el medio líquido del frasco, pero no crecer suficientemente sobre las superficies del Slide. Si el medio del frasco está turbio o evidencia hemólisis u otros signos de crecimiento microbiano, pero los medios en la bandeja no producen recuperación del organismo después de inclinar el sistema y volver a incubarlo, se debe hacer un subcultivo a partir del medio del frasco e incubar la placa del subcultivo en una atmósfera apropiada (por ejemplo, la proporcionada por el sistema **BBL CampyPak**) (vea "Disponibilidad"). Por otro lado, los organismos anaerobios estrictos no crecerán en las superficies de agar del Slide, aunque pueden crecer en el medio líquido del frasco en algunos casos excepcionales.

El polianetosulfonato sódico (SPS) inhibe el crecimiento de ciertas especies de micoplasmas y, por lo tanto, el sistema de hemocultivo **BBL SEPTI-CHEK** no deberá utilizarse para su aislamiento.⁵

La neutralización de la actividad antimicrobiana por las resinas varía dependiendo de la dosis y el tiempo de la toma de la muestra. Para obtener información acerca de los agentes antimicrobianos que son neutralizados por resinas, contacte al representante local de Becton Dickinson.

Los medios de cultivo a veces contienen pequeños números de organismos no viables derivados de los constituyentes del medio, que pueden ser visibles en frotis de medios de hemocultivo sin inocular. Otros orígenes de organismos no viables visibles tras hacer la tinción de Gram incluyen los reactivos de tinción, el aceite de inmersión, los Slides y las muestras utilizadas para hacer el inóculo. Si hay incertidumbre sobre la validez de la tinción de Gram, se debe volver a incubar el cultivo durante una o dos horas más y repetirse el procedimiento de hacer el frotis y la tinción antes de emitir el informe.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Cuando el frasco de hemocultivo **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas y el **BBL SEPTI-CHEK** Slide se usan juntos, permiten el aislamiento de microorganismos aerobios y facultativos.

Se realizaron estudios de cultivos sembrados utilizando niveles de inóculo de 10 – 100 UFC por frasco. La siguiente lista enumera los organismos que crecieron en **BBL SEPTI-CHEK TSB** con resinas junto con el **BBL SEPTI-CHEK** Slide en el cual se observó crecimiento dentro de cinco (5) días.

<i>Acinetobacter anitratus</i> ATCC 33498	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ** ATCC 43069
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	<i>Neisseria meningitidis</i> ** ATCC 13090
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	<i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 10211	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
<i>Haemophilus influenzae</i> * ATCC 19418	<i>Xanthomonas maltophilia</i> ATCC 13637
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	

* con Enriquecimiento **BBL IsoVitalEx**

** con 3,5 mL de sangre fresca o Suplemento **BACTEC FOS**

Estudios en nuestro establecimiento† han mostrado que los agentes antimicrobianos son neutralizados efectivamente por las resinas utilizadas en el medio **BACTEC** con resinas. En estas pruebas, se añadieron agentes antimicrobianos en concentraciones clínicamente relevantes directamente a los medios con resinas antes de la inoculación con cepas sensibles. Estas pruebas se realizaron en forma paralela utilizando medios sinresinas como controles. Entre los agentes antimicrobianos neutralizados por las resinas se encuentran las penicilinas, cefalosporinas (1^a, 2^a y 3^a generación), macrólidos, aminoglicósidos, fluorquinolonas, lincomicinas, tetraciclina y cloranfenicol.

†Datos en archivo, Becton Dickinson Microbiology Systems.

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
243189	Frasco de cultivo BBL SEPTI-CHEK TSB (Caldo de soja Trypticase) con resinas, 10 frascos de 70 mL.
243181	BBL SEPTI-CHEK Slide (agar chocolate, agar MacConkey y agar malta), cultivo de sangre/slide de subcultivo, 10 slides.
243500	BBL SEPTI-CHEK Slide (agar chocolate, agar MacConkey y agar malta), cultivo de sangre/slide de subcultivo, 50 slides.
243563	Adaptador para la extracción de sangre BBL SEPTI-CHEK , caja de 50.
243247	Gradilla de inversión, frasco de 70 mL, paquete de uno.
271056	Subunidades y unidades de ventilación para frascos de cultivo, caja de 100.

BIBLIOGRAFIA: Ver "Referencias" en el texto en inglés.

**BECTON
DICKINSON**

Becton Dickinson France S.A.
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix, France

MADE
IN
USA