


Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA™ Antibiotic Mixture

English: pages 1 – 5 Italiano: pagine 15 – 19
 Français : pages 5 – 10 Português: páginas 20 – 24
 Deutsch: Seiten 10 – 15 Español: páginas 25 – 29

 8809501JAA(03)
 2016-05

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Покупы вам poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteyts lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőtől. / Нұсқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD pārstāvi. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

INTENDED USE

The **BBL™ MGIT™** Mycobacteria Growth Indicator Tube supplemented with **BBL™ MGIT™** OADC enrichment and **BBL™ MGIT™ PANTA™** antibiotic mixture, when appropriate, is intended for the detection and recovery of mycobacteria. Acceptable specimen types are digested and decontaminated clinical specimens (except urine) and sterile body fluids (except blood).

SUMMARY AND EXPLANATION

From 1985 to 1992, the number of MTB cases reported increased 18%. Tuberculosis still kills an estimated 3 million persons a year worldwide, making it the leading infectious disease cause of death.¹ Between 1981 and 1987, AIDS case surveillances indicated that 5.5% of the patients with AIDS had disseminated nontuberculous mycobacterial infections, e.g., MAC. By 1990, the increased cases of disseminated nontuberculous mycobacterial infections had resulted in a cumulative incidence of 7.6%.² In addition to the resurgence of MTB, multidrug-resistant MTB (MDR-TB) has become an increasing concern. Laboratory delays in the growth, identification and reporting of these MDR-TB cases contributed at least in part to the spread of the disease.³

The U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) have recommended that every effort must be made by laboratories to use the most rapid methods available for diagnostic mycobacteria testing. These recommendations include the use of both a liquid and a solid medium for mycobacterial culture.³

The **MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contains 4 mL of modified Middlebrook 7H9 Broth base.^{4,5} The complete medium, with 0.5 mL OADC enrichment and 0.1 mL of **PANTA** antibiotic mixture, is one of the most commonly used liquid media for the cultivation of mycobacteria. All types of clinical specimens, pulmonary as well as extra-pulmonary (except blood and urine), can be processed for primary isolation in the **MGIT** tube using conventional methods.⁶ The processed specimen is inoculated into a **MGIT** tube, incubated and read daily from the second day of incubation using a longwave UV light. At the time of tube positivity, there are approximately 10⁴ – 10⁷ CFU/mL of mycobacteria present.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

A fluorescent compound is embedded in silicone on the bottom of 16 x 100 mm round-bottom tubes. The fluorescent compound is sensitive to the presence of oxygen dissolved in the broth. Initially, the large amount of dissolved oxygen quenches emissions from the compound and little fluorescence can be detected. Later, actively respiring microorganisms consume the oxygen and allow the fluorescence to be observed using a 365 nm UV transilluminator or longwave UV light (Wood's lamp). Growth can also be detected by the presence of a non-homogeneous turbidity or small grains or flakes in the culture medium.

The medium components are substances essential for the rapid growth of mycobacteria. Oleic acid is utilized by tubercle bacilli and plays an important role in the metabolism of mycobacteria. Albumin acts as a protective agent by binding free fatty acids, which may be toxic to *Mycobacterium* species, thereby enhancing their recovery. Dextrose is an energy source. Catalase destroys toxic peroxides that may be present in the medium.

Contamination may be reduced by supplementing the combined **BBL MGIT** base and **BBL MGIT** OADC enrichment with the **BBL MGIT PANTA** Antibiotic Mixture prior to inoculation with a clinical specimen.

REAGENTS

The **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contains: 110 µL of fluorescent indicator and 4 mL of broth. The indicator contains Tris 4, 7-diphenyl-1,10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate in a silicone rubber base. The tubes are flushed with 10% CO₂ and capped with polypropylene caps.

Approximate Formula* Per L Purified Water

Modified Middlebrook 7H9 Broth Base.....	5.9 g
Casein peptone.....	1.25 g

BBL MGIT OADC contains 15 mL Middlebrook OADC enrichment.

Approximate Formula* Per L Purified Water

Bovine albumin.....	50.0 g	Catalase.....	0.03 g
Dextrose.....	20.0 g	Oleic acid.....	0.6 g

The **BBL MGIT PANTA** vial contains a lyophilized mixture of antimicrobial agents.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized **PANTA**

Polymyxin B.....	6,000 units	Trimethoprim.....	600 µg
Amphotericin B.....	600 µg	Azlocillin.....	600 µg
Nalidixic acid.....	2,400 µg		

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

Directions for Use: Reconstitute a lyophilized vial of **BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture with 3 mL of sterile distilled or deionized water.

Warnings and Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Pathogenic microorganisms including Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus may be present in specimens. "Universal Precautions"^{1,2} should be followed in handling all items contaminated with blood or other body fluids.

Working with *Mycobacterium tuberculosis* grown in culture requires Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.⁶

Prior to use, each **MGIT** tube should be examined for evidence of contamination or damage. Discard any tubes if they appear unsuitable or exhibit fluorescence prior to use.

Dropped tubes should be examined carefully. If damage is seen, the tube should be discarded.

Wear UV protective glasses when observing fluorescence and use only longwave illumination (365 nm). DO NOT USE SHORTWAVE UV LIGHT FOR READING TUBES.

Autoclave all inoculated **MGIT** tubes prior to disposal.

Storage of Reagents: BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes – On receipt, store at 2–25 °C (35–77 °F). DO NOT FREEZE. Minimize exposure to light. Broth should appear clear and colorless. Do not use if turbid. **MGIT** tubes stored as labelled prior to use may be inoculated up to the expiration date and incubated for up to eight weeks.

BBL MGIT OADC – On receipt, store in the dark at 2–8 °C. Avoid freezing or overheating. Do not open until ready to use. Minimize exposure to light.

BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture – On receipt, store lyophilized vials at 2–8 °C. Once reconstituted, the **PANTA** mixture may be used within 72 h, provided it is stored at 2–8 °C, or up to 6 months if stored at -20 °C or colder. Once thawed, the **PANTA** mixture must be used immediately. Discard unused portion.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

All specimens should be collected and transported as recommended by the CDC, the *Clinical Microbiology Procedures Handbook* or your laboratory procedure manual.^{6,8}

DIGESTION, DECONTAMINATION AND CONCENTRATION

Specimens from different body sites should be processed for inoculation of **MGIT** tubes as follows:

SPUTUM: Specimens should be processed using the NALC-NaOH method as recommended by the CDC's *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶ Alternatively, use the **BBL™ MycoPrep™** kit for processing mycobacterial specimens (see "Availability").

GASTRIC ASPIRATES: Specimens should be decontaminated as in sputum. If the volume of the specimen is more than 10 mL, concentrate by centrifugation. Resuspend the sediment in about 5 mL of sterile water and then decontaminate. Add a small amount of NALC powder (50 – 100 mg) if the specimen is thick or mucoid. After decontamination, concentrate again prior to inoculation into **MGIT** tube.

BODY FLUIDS (CSF, synovial fluid, pleural fluid, etc.): Specimens which are collected aseptically and are expected to have no other bacteria can be inoculated without decontamination. If the specimen volume is more than 10 mL, concentrate by centrifugation at 3,000 x g for 15 min. Pour off supernatant fluid. Inoculate **MGIT** tube with sediment. Specimens that are expected to contain other bacteria must be decontaminated.

TISSUE: Tissue specimens should be processed as recommended by the CDC's *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

STOOL: Suspend 1 g of feces in 5 mL of Middlebrook Broth. Agitate the suspension on a vortex mixer for 5 sec. Proceed to the NALC-NaOH procedure as recommended by the CDC's *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

PROCEDURE

Materials Provided: **BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes**, 4 mL, package of 25 and 100 Tubes, or **BBL MGIT OADC**, 6 vials, 15 mL, or **BBL MGIT PANTA™ Antibiotic Mixture**, 6 lyophilized vials (see "Availability").

Materials Required But Not Provided: **Falcon™** brand 50 mL centrifuge tubes, 4% sodium hydroxide, 2.9% sodium citrate solution, N-acetyl-L-cysteine powder, phosphate buffer pH 6.8, vortex mixer, 37 °C incubator, 1 mL sterile pipettes, sterile transfer pipettes, UV transilluminator (365 nm) or Wood's lamp with longwave bulb or blacklight, 0.4% sodium sulfite solution (procedure below), **BBL™** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, **BBL™ MycoPrep™**, **BBL™** Middlebrook 7H9 Broth (see "Availability") or other mycobacterial agar or egg-based medium, tissue homogenizer or sterile swab, **BBL™** Normal Saline (see "Availability"), microscope and materials for staining slides, pipettes 100 µL and 500 µL, corresponding pipette tips, 5% sheep blood agar plate, Eye Guard Spectacles (UVP #UVC-303, San Gabriel, CA) and tuberculocidal disinfectant.

Inoculation of MGIT Tubes:

1. Label the **MGIT** tube with specimen number.
2. Unscrew the cap and aseptically add 0.5 mL of **MGIT OADC**.
3. Aseptically add 0.1 mL of reconstituted **MGIT PANTA** antibiotic mixture. For best results, the addition of OADC enrichment and **PANTA** antibiotic mixture should be made just prior to specimen inoculation.
4. Add 0.5 mL of the concentrated specimen suspension prepared above. Also add a drop (0.1 mL) of specimen to a 7H10 agar plate or other mycobacterial solid agar or egg-based medium. *NOTE: Specimen volumes greater than 0.5 mL can increase contamination or otherwise adversely affect the performance of the tubes.*
5. Tightly recap the tube and mix well.
6. Tubes should be incubated at 37 °C.

For specimens in which mycobacteria with different incubation requirements are suspected, a duplicate **MGIT** tube can be set up and incubated at the appropriate temperature; e.g. 30 °C or 42 °C. Inoculate and incubate at the required temperature.

For specimens suspected of containing *Mycobacterium haemophilum*, a source of hemin must be introduced into the tube at the time of inoculation and the tube incubated at 30 °C. Aseptically place one disc of **BBL™ Taxo™** Differentiation Discs X into each **MGIT** tube requiring the addition of hemin prior to inoculation of specimen (see "Availability").

7. Read tubes daily starting on the second day of incubation following the procedure "Reading the Tubes" below.

Preparation of Interpretive Negative and Positive Control Tubes: Use of the Positive and Negative Control tubes is only for the interpretation of fluorescence and is not intended as a control for the performance of the media.

Positive Control Tube:

1. Empty broth from an uninoculated **MGIT** tube.
2. Label tube as a Positive Control and record the date.
3. Prepare 0.4% sodium sulfite solution (0.4 g in 100 mL sterile distilled or deionized water). Discard unused portion.
4. Add 5 mL of sodium sulfite solution to the tube, replace the cap, tighten and allow the tube to stand for a minimum of 1 h at room temperature before use.
5. Positive Control tubes can be used many times. Each Positive Control tube can be used for up to four weeks when stored at room temperature.

Negative Control Tube: An unopened, uninoculated **MGIT** tube is used as a control.

Reading the Tubes:

1. A Positive Control and a Negative Control are important for correctly interpreting results.
2. Remove tubes from the incubator. Place tubes on the UV light next to a Positive Control tube and an uninoculated tube (Negative Control). It is recommended that one rack at a time of tubes (4 by 10 tubes) be placed on the UV light. *NOTE: Wear UV protective glasses when observing fluorescence. Normal room light is preferred. Avoid reading tubes in a sunlit room or in a darkened room.*
3. Visually locate **MGIT** tubes that show bright fluorescence. Fluorescence is detected as a bright orange color in the bottom of the tube and also an orange reflection on the meniscus. The **MGIT** tube should then be taken out of the rack and compared to Positive Control and Negative Control tubes. The Positive Control should show a high amount of fluorescence (very bright orange color). The Negative Control should have very little or no fluorescence. If fluorescence in the **MGIT** tube looks more like the Positive Control, it is a positive tube. If it looks more like the Negative Control, it is a negative tube. Growth can also be detected by the presence of a non-homogeneous turbidity, small grains or flakes in the culture medium.
4. Positive tubes should be stained for acid-fast bacilli. Smear-negative tubes should be checked for bacterial contamination. Subcultures for identification and drug susceptibility testing may be performed using fluid from the **BBL MGIT** tube.
5. Negative tubes should continue to be read daily for eight weeks or longer depending on the type of specimen and the past experience of the laboratory. Alternative reading schedules may be established. Failure to read the tubes for several days, such as during weekends or holidays, may delay the detection of positive tubes, but will not otherwise adversely affect the performance of the media. Tubes should be visually checked for the presence of turbidity and small grains or granules before discarding. Negative **MGIT** tubes cannot be reused. If mycobacterial growth is suspected, follow the "Processing a Positive **MGIT** Tube" procedure as stated below.

Reprocessing Contaminated MGIT Tubes: Contaminated **MGIT** tubes may be re-decontaminated and re-concentrated using the same procedure used to process the specimen initially.

1. Add the contents of the contaminated **MGIT** tube to a 50 mL plastic centrifuge tube.
2. Add 5 mL NALC-NaOH solution to the centrifuge tube. With the cap tightened, vortex the tube for 5 – 20 s.
3. Allow the tube to stand for 15 – 20 min. Do not treat for more than 20 min.
4. Add 35 mL sterile phosphate buffer pH 6.8. Replace the cap and mix the contents.
5. Concentrate the specimen in a centrifuge at a speed of 3,000 $\times g$ for 15 min.
6. Carefully decant the supernatant fluid from the pellet. Resuspend the pellet using a sterile Pasteur pipette with phosphate buffer pH 6.8.
7. Inoculate 0.5 mL of the suspension to a new **MGIT** tube.

User Quality Control: Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

Quality Control Certificates are provided on the BD website. Quality Control Certificates list test organisms, including ATCC® cultures specified in the CLSI Approved Standard M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.⁹

NOTE: Middlebrook 7H9 Broth (supplemented) is exempt from User QC testing according to CLSI M22-A3.⁹

RESULTS

A culture-positive sample is identified by the observation of fluorescence or non-homogenous turbidity, small grains or flakes in an inoculated **MGIT** tube. Positive tubes should be subcultured and an acid-fast smear prepared. A positive acid-fast smear result indicates the presumptive presence of viable microorganisms in the tube.

Processing a positive MGIT Tube:

NOTE: All steps should be performed in a biological safety cabinet.

- a) Remove **MGIT** tube from test rack.
- b) Using a sterile transfer pipet, remove an aliquot from the bottom of the tube (approx. 0.1 mL) for stain preparations (AFB and Gram stains).
- c) Inspect smear and preparations. Report preliminary results only after acid-fast stain evaluation.

If AFB positive, subculture to solid media and report as: Growth positive, AFB smear positive, ID pending.

If microorganisms other than AFB are present, report as: Growth positive, AFB smear negative, Contaminated.

If no microorganisms are present, no reportable result. Subculture broth to blood agar plate and mycobacterial culture medium; repeat smear using the addition of protein to ensure the inoculum has been adequately fixed to the slide.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Recovery of mycobacteria in the **MGIT** tube is dependent on the number of organisms present in the specimen, specimen collection methods, patient factors such as presence of symptoms, prior treatment and the method of processing.

Decontamination with the N-acetyl-L-cysteine Sodium hydroxide (NALC-NaOH) or Oxalic acid methods is recommended. Other decontamination methods have not been tested in conjunction with the **BBL MGIT** medium. Digestant-decontaminant solutions may have harmful effects on mycobacteria.

Colony morphology and pigmentation can only be determined on solid media. Mycobacteria may vary in acid-fastness depending on strain, age of culture and other variables. The consistency of microscopic morphology in **BBL MGIT** medium has not been established.

An AFB smear-positive **MGIT** tube can be subcultured, to both selective and nonselective mycobacterial media, for isolation to perform identification and susceptibility testing.

MGIT tubes which appear positive may contain other non-mycobacterial species. Non-mycobacterial species may overgrow mycobacteria present. Such **MGIT** tubes should be re-decontaminated and re-cultured.

MGIT tubes which appear positive may contain one or more species of mycobacteria. Faster growing mycobacteria may develop positive fluorescence prior to slower growing mycobacteria; therefore, it is important to subculture positive **MGIT** tubes to ensure proper identification of all mycobacteria present in the sample.

Specimen volumes greater than 0.5 mL can increase contamination or otherwise adversely affect the performance of the **MGIT** tubes.

Due to the richness of the **MGIT** broth and to the non-selective nature of the **MGIT** indicator, it is important follow the stated digestion/decontamination procedure to reduce the possibility of contamination. Adherence to procedural instructions is critical for optimum recovery of mycobacteria.

The use of **PANTA** antibiotic mixture, although necessary for all non-sterile specimens, may have inhibitory effects on some mycobacteria.

Terminal subcultures were not routinely performed during clinical studies. Therefore, an actual false negative rate (defined as a **MGIT** tube that remained negative throughout the eight-week incubation period, was subcultured and grew a mycobacterial organism) cannot be determined at this time.

Seeded culture studies were performed with twenty-three species (ATCC and wild strains) of mycobacteria using inoculum levels ranging from 10³ to 10⁵ CFU/mL. The following species were detected as positive in the **MGIT** tube:

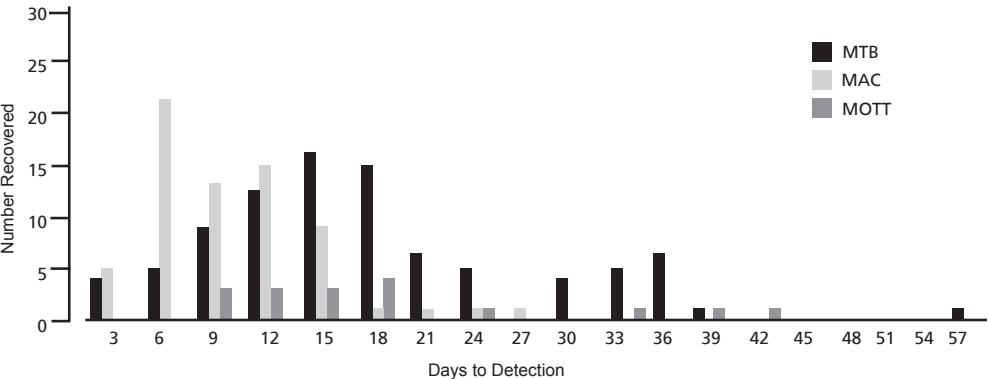
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavescens</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Species recovered during clinical evaluation of the **MGIT** tube.

Clinical studies have demonstrated recovery of mycobacteria from respiratory specimens, gastric aspirates, tissue, stool and sterile body fluids except blood; recovery of mycobacteria from other body fluids has not been established for this product.

EXPECTED VALUES

1 - Frequency distribution of recovery times for clinical trial specimens positive in the **BBL MGIT System** is illustrated in the following figure.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube was evaluated at six clinical sites, which included public health laboratories as well as large acute care hospitals in geographically diverse areas. The site population included patients infected with HIV, immunocompromised patients and transplant patients. The **BBL MGIT** tubes were compared to the **BACTEC™** 460TB radiometric system, the **BBL™ Septi-Chek™** AFB Mycobacteria Culture System and conventional solid growth media for the detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens (except blood and urine). A total of 2801 specimens were tested during the study. The distribution of specimens tested by source was: respiratory (78%), gastric (0.4%), body fluid (9.8%), tissue (7.0%), stool (2.5%) and other (2.4%). A total of 318 specimens were positive which represented 330 isolates recovered during the study. Of these 330 isolates, 253 (77%) were recovered by the **BBL MGIT** tubes, 260 (79%) were recovered by the **BACTEC** 460TB and the **BBL Septi-Chek** AFB and 219 (66%) were recovered by conventional solid media. The **BBL MGIT** tubes demonstrated a 0.5% false positive rate (**MGIT** fluorescent, no AFB present). The **BBL MGIT** tubes failed to recover 3.7% of the isolates which were recovered in one or more of the reference systems (**BACTEC** 460TB, **BBL Septi-Chek** AFB or conventional solid media). While this percentage represents a potential loss of recovery, it is not indicative of an actual false negative determination (refer to “Limitations of the Procedure” section). Use of a second medium, as recommended, will increase the probability of recovery of mycobacterial organisms. The average breakthrough contamination rate for the **BBL MGIT** tubes was 9.7%.

BACTEC SITES

Table 2 – Detection of Mycobacteria Positive Isolates in Clinical Evaluations

Isolate	Total Isolates	Total MGIT	MGIT Only	Total BACTEC	BACTEC Only	Total CONV	CONV Only
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
<i>M. kansasii</i>	5	2	0	5	1	4	0
<i>M. fortuitum</i>	9	5	3	3	1	5	3
<i>M. chelonae</i>	2	0	0	2	1	1	0
<i>M. xenopi</i>	2	0	0	2	2	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	11	4	1	4	1	9	5
<i>M. flavescens</i>	2	1	0	2	1	0	0
All MYCO	244*	180*	15*	203	27	168	17

*NOTE: Fourteen **MGIT ONLY** isolates are not included in this data. Presumptive identification was performed with no final confirmation of ID.

SEPTI-CHEK SITES

Table 3 – Detection of Mycobacteria Positive Isolates in Clinical Evaluations

Isolate	Total Isolates	Total MGIT	MGIT Only	Total SEPTI-CHEK	SEPTI-CHEK Only	Total CONV	CONV Only
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
<i>M. kansasii</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	2	2	2	0	0	0	0
ALL MYCO	67*	54*	9*	57	4	51	0

*NOTE: Five MGIT ONLY isolates are not included in this data. Presumptive identification was performed with no final confirmation of ID.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
245111	BD BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 4 mL, carton of 25 tubes.
245113	BD BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 4 mL, carton of 100 tubes.
245116	BD BBL™ MGIT™ OADC, 15 mL, carton of 6 vials. Each vial sufficient for 25 MGIT tubes.
220908	BD BBL™ Lowenstein-Jensen Medium Slants, package of 10 (20 x 148 mm tubes with cap).
220909	BD BBL™ Lowenstein-Jensen Medium Slants, carton of 100 (20 x 148 mm tubes with cap).
240862	BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/Decontamination Kit, ten 75 mL bottles of NALC-NaOH solution and 5 packages of phosphate buffer.
240863	BD BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/Decontamination Kit, ten 150 mL bottles of NALC-NaOH solution and 10 packages of phosphate buffer.
245114	BD BBL™ MGIT™ PANTA™ Antibiotic Mixture, lyophilized, carton of 6 vials. Each vial sufficient for 25 MGIT tubes.
220959	BD BBL™ Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, carton of 100.
295939	BD BBL™ Middlebrook 7H9 Broth, 8 mL, package of 10 tubes.
221818	BD BBL™ Normal Saline, 5 mL, package of 10.
221819	BD BBL™ Normal Saline, 5 mL, carton of 100.
231729	BD BBL™ Taxo™ Differentiation Discs X, 50 discs/cartridge.

REFERENCES

1. Bloom, B.R., and C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064.

2. Horsburg Jr., C.R. 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 324:1332-1338.

3. Tenover, F.C., et al. 1993. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-770.

4. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295-296.

5. Youmans, G.P. 1979. Cultivation of mycobacteria, the morphology and metabolism of mycobacteria, p. 25-35. *Tuberculosis*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.


6. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. USDHHS, Centers for Disease Control, Atlanta.

7. Bloodborne pathogens. Code of Federal Regulations, Title 29, Part 1910.1030, Federal Register 1991, 56:64175-64182.

8. Isenberg, Henry D. 1992. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Approved Standard M22-A3. Quality control for commercially prepared microbiological culture media, 3rd ed., CLSI, Wayne, Pa.

Technical Information: In the United States, contact BD Technical Service and Support at 1.800.638.8663 or www.bd.com.



**Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment,
PANTA Antibiotic Mixture**

**(Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne, supplément d’enrichissement
OADC et complexe d’antibiotiques PANTA)**

Français

APPLICATION

Le Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** (Mycobacteria Growth Indicator Tube) additionné du supplément d’enrichissement **BBL MGIT OADC** et du complexe d’antibiotiques **BBL MGIT PANTA**, comme il convient, est destiné à la détection et l’isolement de mycobactéries à partir d’échantillons cliniques. Les types d’échantillons acceptables sont des échantillons cliniques digérés et décontaminés (à l’exception de l’urine) et des liquides biologiques stériles (à l’exception du sang).

RESUME ET EXPLICATION

De 1985 à 1992, le nombre des cas de tuberculose (TB) confirmés a augmenté de 18%. La tuberculose tue encore un nombre estimé à environ 3 millions de personnes par an à l’échelle mondiale, en faisant la principale maladie infectieuse cause de mortalité.¹ Entre 1981 et 1987, le suivi des cas de SIDA indiquait que 5,5 % des malades du SIDA avaient contracté des infections mycobactériennes non tuberculeuses comme MAC. Dès 1990 l’augmentation des cas de dissémination des infections mycobactériennes non tuberculeuses se traduisait par une incidence cumulée de 7,6%.² En plus de la recrudescence de la tuberculose, les souches de TB résistantes aux antibiotiques (MDR-TB) deviennent un souci croissant. Les délais encourus au niveau des laboratoires dans la culture, l’identification et la publication de ces cas de résistance aux antibiotiques ont au moins en partie favorisé la dissémination de cette maladie.³

Le U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommande que les laboratoires fassent tous les efforts possibles pour appliquer les méthodes les plus rapides actuellement disponibles pour le diagnostic des mycobactéries. Ces recommandations font état de l’utilisation conjointe d’un milieu de culture liquide et d’un milieu de culture solide des mycobactéries.³

Le Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **MGIT** contient 4 mL d'un Bouillon de base Middlebrook 7H9 modifié.^{4,5} Le milieu complet, additionné de 0,5 mL de supplément d'enrichissement OADC et de 0,1 mL de complexe d'antibiotiques **PANTA**, est un des milieux liquides les plus communément utilisés pour la culture des mycobactéries.

Les méthodes traditionnelles peuvent être appliquées à tous les types d'échantillons cliniques pulmonaires ou non (à l'exception du sang et de l'urine) pour réaliser un isolement primaire dans le tube **MGIT**.⁶ L'échantillon traité est inoculé dans un tube **MGIT** et mis à incuber, une lecture quotidienne étant faite à partir du deuxième jour de l'incubation en lampe UV à ondes longues. Au moment où le tube devient positif, il y a environ 10⁴ – 10⁷ UFC/mL de mycobactéries présentes.

PRINCIPES DE LA METHODE

Un composé fluorescent est incorporé à de la silicone au fond de tubes de 16 x 100 mm à fond rond. Le composé fluorescent est sensible à la présence de l'oxygène dissous dans le bouillon. Initialement, la grande quantité d'oxygène dissous inhibe les émissions du composé et une faible fluorescence peut être détectée. Subséquemment, les micro-organismes, en respirant, consomment l'oxygène du milieu et permettent l'observation de la fluorescence en utilisant un transilluminateur avec des UV à 365 nm ou une lampe UV à ondes longues (lampe de Wood). La croissance peut aussi être détectée par la présence d'une turbidité non-homogène ou de petits grains ou flocons dans le milieu de culture.

Les composants du milieu représentent des substances essentielles à la croissance rapide des mycobactéries. L'acide oléique est utilisé par le bacille tuberculeux et joue un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. L'albumine agit comme agent protecteur en liant les acides gras libres qui peuvent être toxiques pour des espèces de *Mycobacterium*, augmentant ainsi leur récupération. Le dextrose est une source d'énergie. La catalase détruit les peroxydes toxiques qui peuvent être présents dans le milieu.

La contamination peut être réduite en additionnant à la combinaison milieu de base **BBL MGIT**/supplément d'enrichissement de **BBL MGIT** OADC, le complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** avant l'inoculation avec un échantillon clinique.

REACTIFS

Le Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** contient : 110 µL d'un indicateur fluorescent et 4 mL de bouillon. L'indicateur contient du chlorure de Tris 4,7-diphényl-1,10-phénanthroline ruthénium pentahydraté dans une base de caoutchouc à silicone. Les tubes sont gazés avec 10 % de CO₂ et fermés avec des capuchons en polypropylène.

Formule approximative* par L d'eau purifiée

Bouillon de base Middlebrook 7H9 modifié.....	5,9 g
Peptone de caséine.....	1,25 g

BBL MGIT OADC contient 15 mL de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC.

Formule approximative* par L d'eau purifiée

Albumine bovine	50,0 g	Catalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g	Acide oléique	0,6 g

L'ampoule de **BBL MGIT PANTA** contient un mélange lyophilisé d'agents antimicrobiens.

Formule approximative* par ampoule lyophilisée **PANTA**

Polymixime B	6.000 unités	Triméthoprime	600 µg
Amphotéricine B	600 µg	Azlocilline.....	600 µg
Acide nalidixique	2.400 µg		

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

Mode d'emploi : reconstituer une ampoule lyophilisée de **MGIT PANTA** avec 3 mL d'eau distillée ou désionisée stérile.

Avertissements et précautions : pour diagnostic *in vitro*.

Des microorganismes pathogènes, parmi ceux-ci le virus de l'hépatite B et le virus d'immunodéficience humaine, peuvent être présents dans les échantillons. Des « précautions universelles »^{1,2} ainsi que les recommandations des institutions devront être suivies dans la manipulation de tous les éléments contaminés avec du sang ou d'autres liquides physiologiques.

Travailler avec des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* nécessite d'observer des procédures de protection contre les dangers biologiques de niveau 3 et l'usage d'équipement et de matériel de contention.⁶

Avant d'être utilisé, chaque tube **MGIT** doit être inspecté pour vérifier l'absence de contamination ou de dommage. Tout tube qui paraît ne pas convenir ou montre une fluorescence avant d'être utilisé doit être jeté.

Les tubes qui sont tombés doivent être soigneusement examinés. S'ils sont endommagés d'une manière quelconque, ils doivent être jetés. Porter des lunettes de protection contre les UV lors des lectures en lampe UV et n'utiliser qu'une lampe à longue longueur d'ondes (365 nm). **N'UTILISER PAS DE LAMPE UV A COURTE LONGUEUR D'ONDES POUR EFFECTUER LES LECTURES DES TUBES.**

Tous les tubes **MGIT** inoculés devront être autoclavés avant d'être jetés.

Conservation des réactifs : tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** – Dès réception, conserver entre 2–25 °C. NE PAS CONGELER. Minimiser l'exposition à la lumière. Le bouillon doit être clair et incolore. Ne pas l'utiliser s'il est turbide. Les tubes **MGIT** conservés dans les conditions décrites sur l'étiquette jusqu'au moment de l'utilisation peuvent être inoculés jusqu'à la date de péremption et incubés jusqu'à huit semaines.

BBL MGIT OADC – Dès réception, conserver entre 2–8 °C dans l'obscurité. Eviter la congélation ou une surchauffe. Ne pas ouvrir avant d'être prêt à l'utiliser. Minimiser l'exposition à la lumière.

Complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** – Dès réception, conserver les ampoules lyophilisées entre 2–8 °C. Une fois reconstitué, le mélange **PANTA** reste bon à l'emploi pendant 72 h à condition d'être conservé à 2–8 °C ou pendant 6 mois à condition d'être congelé à -20 °C ou plus froid. Une fois décongelé, le mélange **PANTA** doit être utilisé immédiatement et la portion non-utilisée jetée.

MANIPULATION ET PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Tous les échantillons doivent être recueillis et transportés selon les recommandations du CDC, du *Clinical Microbiology Procedures Handbook* ou les directives de votre laboratoire.^{6,8}

DIGESTION, DECONTAMINATION ET CONCENTRATION

Avant de servir à l'inoculation des tubes **MGIT**, les échantillons provenant de différents sites anatomiques devraient être traités comme suit :

CRACHATS : les échantillons doivent être traités selon la méthode utilisant NALC-NaOH comme recommandé par le CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶ Une autre alternative est d'utiliser la trousse **BBL MycoPrep** pour analyser les échantillons mycobactériens (cf. "Matériel disponible").

ASPIRATIONS GASTRIQUES : les échantillons doivent être décontaminés comme dans le cas des crachats. Si le volume de l'échantillon est supérieur à 10 mL, concentrer par centrifugation. Remettre en suspension le sédiment dans environ 5 mL d'eau stérile et décontaminer. Ajouter une petite quantité de poudre de NALC (50 – 100 mg) si l'échantillon est visqueux ou mucoïde. Après décontamination, concentrer de nouveau avant d'inoculer un tube **MGIT**.

LIQUIDES BIOLOGIQUES (LCR, liquide synovial, liquide pleural, etc.) : les échantillons prélevés de manière aseptique et présumés exempts de bactéries autres que des mycobactéries peuvent être inoculés sans décontamination. Si le volume de l'échantillon est plus grand que 10 mL, concentrer par centrifugation à 3.000 x g pendant 15 min. Éliminer le surnageant. Inoculer le tube **MGIT** avec le sédiment. Les échantillons présumés contaminés par d'autres bactéries doivent être décontaminés.

TISSUS : les échantillons tissulaires doivent être analysés comme recommandé par le CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

SELLE : suspendre 1 g de matières fécales dans 5 mL de Bouillon Middlebrook. Agiter la suspension avec un agitateur vortex pendant 5 sec. Suivre la méthode utilisant NALC-NaOH comme recommandé par le CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

METHODE

Matériel fourni : tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT**, 4 mL, coffret de 25 et 100 tubes, ou **BBL MGIT OADC**, 6 ampoules, 15 mL, ou complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA**, 6 ampoules lyophilisées (voir "Matériel disponible").

Matériaux requis mais non fournis : tubes à centrifuger de 50 mL de marque **Falcon**, hydroxyde de sodium à 4 %, solution de citrate de sodium à 2,9 %, poudre de N-acétyl-L-cystéine, tampon phosphate pH 6,8, agitateur vortex, incubateur à 37 °C, pipettes stériles de 1 mL, pipettes de transfert stériles, transilluminateur à UV (365 nm) ou une lampe de Wood avec une ampoule émettant des ondes longues ou de la lumière noire, solution de sulfite de sodium à 0,4 % (méthode ci-après), gélose **BBL Middlebrook** et Cohn 7H10, **BBL MycoPrep**, Bouillon **BBL Middlebrook 7h9** (voir "Matériel disponible"), ou un autre milieu pour mycobactéries à base d'agar ou d'oeufs. Homogénéiseur pour tissus ou des écouvillons stériles, sérum physiologique normal **BBL** (voir "Matériel disponible"), microscope et matériel nécessaire pour colorer les lames, pipettes de 100 µL et 500 µL, embouts de pipette correspondants, boîte de pétri de gélose à 5% de sang de mouton, lunettes Eye Guard Spectacles (UVP N° UVC-303, San Gabriel, CA, USA) et un désinfectant mycobactéricide.

Inoculation des tubes MGIT :

1. Étiqueter le tube **MGIT** avec le numéro de l'échantillon.
2. Dévisser le capuchon et ajouter de manière aseptique 0,5 mL de **MGIT OADC**.
3. Ajouter de manière aseptique 0,1 mL de complexe d'antibiotiques **MGIT PANTA** reconstitué. Pour de meilleurs résultats, l'ajout du supplément d'enrichissement OADC et du complexe d'antibiotiques **PANTA** doit être fait juste avant l'inoculation de l'échantillon.
4. Ajouter 0,5 mL de la suspension concentrée d'échantillon préparée comme décrit ci-dessus. Déposer aussi une goutte (0,1 mL) d'échantillon sur une gélose 7H10 ou tout autre milieu solide pour mycobactéries à base d'agar ou d'oeufs. *NOTA : un volume d'échantillon supérieur à 0,5 mL peut augmenter la contamination ou réduire d'autres façons la performance des tubes.*
5. Fermer le tube hermétiquement et mélanger vigoureusement.
6. Les tubes doivent être incubés à 37 °C.

Pour les échantillons suspectés de contenir des mycobactéries demandant des conditions d'incubation différentes, un tube **MGIT** double peut être préparé et incubé à une autre température soit 30 °C ou 42 °C comme il convient. Inoculer et incubé à la température demandée.

Pour les échantillons suspectés de contenir *Mycobacterium haemophilum*, une source d'hémine peut être incorporée au tube au moment où l'inoculation est faite, et le tube incubé à 30 °C. Introduire aseptiquement un disque de **BBL Taxo** Differentiation Discs X dans chaque tube **MGIT** demandant l'addition d'hémine avant d'inoculer l'échantillon (voir "Matériel disponible").

7. Après la deuxième journée d'incubation, lire les tubes quotidiennement en suivant la procédure "Lecture des tubes" décrite ci-après.

Préparation des tubes de contrôle d'interprétation positive et négative : les tubes de Contrôles Positif et Négatif ne peuvent servir qu'à l'interprétation de la fluorescence et ne peuvent servir à contrôler la performance des milieux.

Préparation d'un tube de Contrôle Positif :

1. Vider le bouillon d'un tube **MGIT** non inoculé.
2. Étiqueter le tube comme Contrôle Positif et enregistrer la date.
3. Préparer une solution de sulfite de sodium à 0,4 % (0,4 g dans 100 mL d'eau distillée ou désionisée stérile). Jeter la portion non utilisée.
4. Ajouter 5 mL de la solution de sulfite de sodium au tube, remettre le capuchon et laisser reposer le tube pendant au moins 1 h à température ambiante avant de l'utiliser.
5. Les tubes de Contrôle Positif peuvent être utilisés plusieurs fois. Chaque tube de Contrôle Positif peut être utilisé pendant une période allant jusqu'à 4 semaines s'il est conservé à température ambiante.

Tube de Contrôle Négatif : un tube **MGIT** scellé et non-inoculé est utilisé en tant que contrôle.

Lecture des tubes :

1. Un tube de Contrôle Positif et un tube de Contrôle Négatif sont nécessaires à une interprétation correcte des résultats.
2. Retirer les tubes de l'incubateur. Placer les tubes sur la lampe UV à côté d'un tube de Contrôle Positif et un tube non inoculé (Contrôle Négatif). Il est recommandé qu'un seul portoir de tubes à la fois (4 par 10 tubes) soit placé sur la lampe UV. *NOTA : portez des lunettes protectrices contre les UV lorsque vous observez la fluorescence. La lumière naturelle du jour est préférable. Évitez de lire les tubes dans une pièce ensoleillée ou dans une chambre sombre.*
3. Repérer visuellement les tubes **MGIT** montrant une fluorescence vive. La fluorescence se caractérise par une couleur orange vif dans le fond du tube et une réflexion orange sur le ménisque. Le tube **MGIT** doit alors être retiré du support et comparé aux tubes de Contrôles Positif et Négatif. Le tube de Contrôle Positif doit montrer une forte fluorescence (couleur orange vif intense). Le tube de Contrôle Négatif doit montrer une fluorescence faible ou aucune fluorescence. Si la fluorescence du tube **MGIT** se rapproche de celle du tube de Contrôle Positif, c'est un tube positif. Si elle se rapproche de celle du Contrôle Négatif, c'est un tube négatif. La croissance peut aussi être détectée par la présence d'une turbidité non-homogène, ou de petits grains ou de flocons dans le milieu de culture.
4. Les tubes positifs doivent subir une coloration pour les bacilles acido-alcoolo-résistants. Les tubes donnant un résultat négatif devraient être vérifiés pour la présence d'une contamination bactérienne. Des repiquages pour l'identification ou l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques peuvent être effectués à partir du liquide présent dans le tube **BBL MGIT**.
5. Les tubes négatifs doivent continuer à être lus quotidiennement pendant huit semaines ou plus longtemps suivant la nature de l'échantillon et l'expérience passée du laboratoire. Un autre horaire pour la lecture peut être établi. L'absence de lecture pendant plusieurs jours, comme durant les fins de semaine ou les congés, peut retarder la détection des tubes positifs mais n'affectera d'aucune manière la performance du test. Les tubes devraient être vérifiés visuellement pour la présence d'une turbidité, de petits grains ou de granules avant d'être éliminés. Les tubes négatifs **MGIT** ne peuvent pas être réutilisés. Si une croissance mycobactérienne est suspectée, suivre la procédure décrite ci-dessous dans "Analyse d'un tube **MGIT** positif".

Traitement des tubes MGIT contaminés : les tubes **MGIT** contaminés peuvent être décontaminés et re-concentrés au moyen de la procédure initialement utilisée pour préparer l'échantillon.

1. Verser le contenu d'un tube **MGIT** contaminé dans un tube pour centrifugeuse en plastique de 50 mL.
2. Ajouter 5 mL de solution NALC-NaOH dans le tube pour centrifugeuse. Fermer hermétiquement et ajouter au vortex pendant 5 – 20 s.
3. Laisser le tube reposer pendant 15 – 20 min. Ne pas dépasser 20 min.
4. Ajouter 35 mL de tampon phosphate stérile pH 6,8. Remettre le capuchon et mélanger.
5. Concentrer l'échantillon en le centrifugeant à 3.000 x g pendant 15 min.
6. Séparer délicatement le supernatant liquide du caillot de centrifugation. Resuspendre le caillot dans le tampon phosphate pH 6,8 à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
7. Inoculer 0,5 mL de la suspension dans un autre tube **MGIT**.

Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur : Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations locales, nationales et/ou internationales en vigueur, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Des certificats de contrôle de qualité se trouvent dans le site web de BD. Les certificats de contrôle de qualité dressent la liste des microorganismes de test, y compris les cultures ATCC spécifiées dans la norme M22-A3 approuvée par le CLSI, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.⁹

REMARQUE : Le bouillon Middlebrook 7H9 (supplémenté) n'est pas soumis aux tests de Contrôle Qualité par l'utilisateur selon CLSI M22-A3.⁹

RESULTATS

Un échantillon donnant une culture positive est identifié de par l'observation d'une fluorescence ou d'une turbidité non-homogène, ou de petits grains ou de flocons dans un tube **MGIT** inoculé. Les tubes positifs doivent être repiqués et un frottis doit être préparé pour une coloration pour bactéries acido-résistantes. Un frottis positif pour la coloration acido-résistant suggère la présence de micro-organismes viables dans le tube.

Analyse d'un tube **MGIT** positif :

NOTA : toutes les manipulations doivent être faites dans une hotte biologique de sécurité.

- a) Retirer le tube **MGIT** du support.
- b) Utiliser une pipette de transfert stérile pour prélever une fraction aliquote dans le fond du tube (environ 0,1 mL) pour les colorations (AFB et de Gram).
- c) Inspecter le frottis et les préparations. Noter les résultats préliminaires seulement après avoir évalué la coloration acido-résistant.

Si le frottis AFB est positif, repiquer sur milieux solides et noter : croissance positive, frottis AFB positif, identification en cours.

Si des micro-organismes autres que AFB sont présents, noter : croissance positive, frottis AFB négatif, contaminé.

Si aucun organisme n'est présent, aucun résultat ne peut être noté. Repiquer le bouillon sur une gélose au sang et sur milieu de culture pour mycobactérie ; refaire un frottis en ajoutant une protéine pour s'assurer que l'inoculum a été fixé de façon adéquate à la lame.

LIMITES DE LA METHODE

L'obtention de mycobactéries dans un tube **MGIT** dépend du nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon, des méthodes de prélèvement de l'échantillon, de facteurs propres au patient tels que la présence de symptômes, les traitements précédents, et de la méthode de préparation.

Une décontamination avec de la N-acétyl-L-cystéine combinée à de l'hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) ou avec de l'acide oxalique est recommandée. Les autres méthodes de décontamination n'ont pas été expérimentées avec le milieu **BBL MGIT**. Les solutions digestives de décontamination peuvent avoir des effets néfastes sur les mycobactéries.

La morphologie et la pigmentation des colonies ne peuvent être déterminées que sur milieux solides. Les mycobactéries peuvent montrer des différences dans la coloration acido-résistante en fonction de la souche, de l'âge de la culture ou d'autres paramètres. La constance de la morphologie microscopique dans le milieu **BBL MGIT** n'a pas été établie.

Un tube **MGIT** ayant donné un frottis AFB positif peut être repiqué sur des milieux sélectifs et non sélectifs des mycobactéries pour donner des isolats sur lesquels peuvent être effectuées une identification et des analyses de la sensibilité.

Les tubes **MGIT** apparaissant positifs peuvent contenir des espèces autres que des mycobactéries. La croissance des espèces non-mycobactériennes peut excéder celle des mycobactéries. De tels tubes **MGIT** doivent être décontaminés et repiqués.

Les tubes **MGIT** apparaissant positifs peuvent contenir une ou plusieurs espèces de mycobactéries. Les mycobactéries à croissance plus rapide peuvent donner une fluorescence positive avant les mycobactéries à croissance plus lente ; il est, par conséquent, important de repiquer les tubes **MGIT** positifs afin de pouvoir assurer une identification de toutes les mycobactéries présentes dans l'échantillon.

Des volumes d'échantillons supérieurs à 0,5 mL peuvent accroître la contamination ou affecter négativement la performance des tubes **MGIT**.

Du fait de la richesse du Bouillon **MGIT** et de la nature non sélective de l'indicateur **MGIT**, il est important de suivre la procédure décrite de digestion/décontamination pour réduire le risque de contamination. Une stricte observation des instructions de procédure est essentielle pour une récupération optimale des mycobactéries.

L'utilisation du complexe d'antibiotiques **PANTA**, quoique nécessaire pour tous les échantillons non stériles, peut avoir des effets inhibiteurs sur certaines mycobactéries.

Des repiquages finaux n'ont pas été effectués de manière systématique pendant les études cliniques. C'est pourquoi le taux réel de faux négatifs (défini comme un tube **MGIT** qui était resté négatif pendant la totalité des huit semaines d'incubation mais qui, une fois repiqué, a donné une croissance mycobactérienne) n'a pas pu être déterminé jusqu'à présent.

Des études de cultures ensemencées ont été réalisées sur vingt-trois espèces de mycobactéries (ATCC et sauvages) avec des inoculums comptant $10^3 - 10^5$ UFC/mL. Les espèces suivantes ont été considérées comme positives dans le tube **MGIT** :

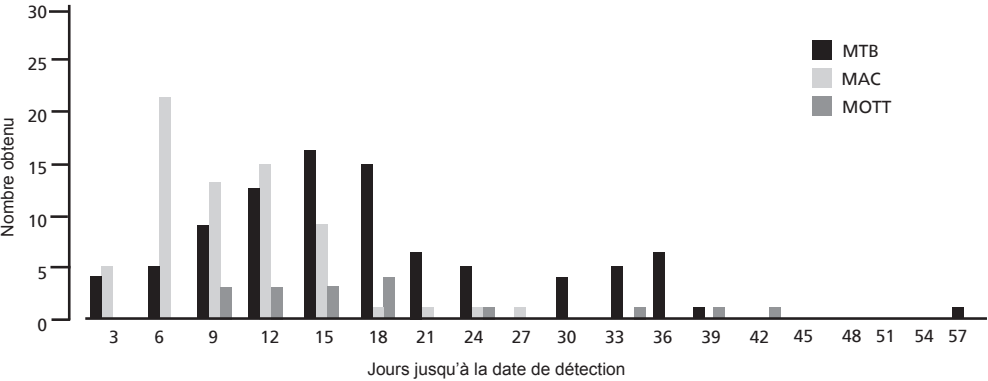
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavescens</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Espèces obtenues lors de l'évaluation clinique du tube **MGIT**.

Les études cliniques ont démontré que des mycobactéries ont pu être collectées à partir d'échantillons respiratoires, d'aspirats gastriques, d'échantillons tissulaires, de selles et de liquides biologiques stériles à l'exception du sang par cette méthode; la croissance de mycobactéries à partir d'autres liquides biologiques n'a pas été réalisée avec ce produit.

VALEURS ESCOMPTEES

Figure 1 – Histogramme de la fréquence des délais de récupération pour les échantillons des essais cliniques positifs dans le système MGIT.



CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Le Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** a été évalué dans six sites cliniques comprenant aussi bien des laboratoires publics que de grands hôpitaux de soins intensifs situés dans diverses régions géographiques. La population de chaque site comprenait des patients infectés par VIH, des patients avec des déficiences immunologiques et des patients ayant reçu une greffe. Les tubes **BBL MGIT** ont été comparés au système de radiométrie **BACTEC 460TB**, au système de culture de mycobactéries **BBL SEPTI CHEK AFB** et aux milieux solides traditionnels pour la détection et l'obtention de mycobactéries dans des échantillons cliniques (à l'exception du sang et de l'urine). Un total de 2801 échantillons ont été analysés dans cette étude. Le classement des échantillons analysés en fonction de leur source d'origine était : respiratoire (78 %), gastrique (0,4 %), liquide biologique (9,8 %), tissulaire (7,0 %), selle (2,5 %) et autre (2,4 %). Un total de 318 échantillons étaient positifs, ce qui correspondait aux 330 isolats obtenus lors de cette étude. De ces 330 isolats, 253 (77 %) ont été récupérés par les tubes **BBL MGIT**, 260 (79 %) ont été récupérés par le **BACTEC 460TB** et le **BBL SEPTI-CHEK AFB**, et 219 (66 %) ont été obtenus avec les milieux solides traditionnels. Les tubes **BBL MGIT** ont donné un taux de faux positifs s'élevant à 0,5 % (fluorescence **MGIT**, pas d'**AFB** présent). Les tubes **BBL MGIT** n'ont pas récupéré 3,7 % des isolats que un ou plusieurs des systèmes de référence (**BACTEC 460TB**, **BBL SEPTI-CHEK AFB** ou les milieux solides traditionnels) avaient récupérés. Alors que ce pourcentage représente une perte potentielle de récupération, il ne correspond pas à une détermination réelle du taux de faux négatifs (cf. "Limites de la Méthode"). L'utilisation d'un second milieu comme il est recommandé augmentera la probabilité de récupération des mycobactéries. Le taux de contamination moyen de novo était de 9,7 % pour les tubes **BBL MGIT**.

SITES BACTEC

Tableau 2 - Détection des isolats positifs de mycobactéries dans les évaluations cliniques

Isolat	Total Isolats	Total MGIT	MGIT Seul	Total BACTEC	BACTEC Seul	Total TRADITION.	TRADITION. Seul
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
M. kansasii	5	2	0	5	1	4	0
M. fortuitum	9	5	3	3	1	5	3
M. chelonae	2	0	0	2	1	1	0
M. xenopi	2	0	0	2	2	0	0
M. simiae	1	1	0	1	0	0	0
M. gordonae	11	4	1	4	1	9	5
M. flavescens	2	1	0	2	1	0	0
Toutes MYCO	244*	180*	15*	203	27	168	17

***NOTA** : quatorze isolats décelés par **MGIT** seulement n'ont pas été inclus dans ces résultats. Une identification présumée a été effectuée et n'a pas reçu de confirmation finale de leur identité.

SITES SEPTI-CHEK

Tableau 3 - Détection d'isolats positifs de mycobactéries dans les évaluations cliniques

Isolat	Total Isolats	Total MGIT	MGIT Seul	Total SEPTI-CHEK	SEPTI-CHEK Seul	Total TRADITION.	TRADITION. Seul
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
M. kansasii	1	1	1	0	0	0	0
M. gordonae	2	2	2	0	0	0	0
TOUTES MYCO	67*	54*	9*	57	4	51	0

***NOTA** : cinq isolats décelés par **MGIT** seulement n'ont pas été inclus dans ces résultats. Une identification présumée a été effectuée mais n'a pas reçu de confirmation finale de leur identité.

MATERIEL DISPONIBLE

N° cat.	Description
245111	Tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne BD BBL MGIT , 4 mL, coffret de 25 tubes.
245113	Tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne BD BBL MGIT , 4 mL, carton de 100 tubes.
245116	BD BBL MGIT OADC, 15 mL, coffret de 6 ampoules. Chaque ampoule est suffisante pour 25 tubes MGIT .
220908	Géloses inclinées BD BBL Lowenstein-Jensen, coffret de 10 (tubes de 20 x 148 mm avec capuchon).
220909	Géloses inclinées BD BBL Lowenstein-Jensen, carton de 100 (tubes de 20 x 148 mm avec capuchon).
240862	Trousse BD BBL MycoPrep de digestion et de décontamination d'échantillons, comprenant dix flacons de 75 mL de solution de NALC-NaOH et 5 sachets de tampon phosphate.
240863	Trousse BD BBL MycoPrep de digestion et de décontamination d'échantillons, comprenant dix flacons de 150 mL de solution de NALC-NaOH et 10 sachets de tampon phosphate.
245114	Complexe d'antibiotiques BD BBL MGIT PANTA , lyophilisé, coffret de 6 ampoules. Chaque ampoule est suffisante pour 25 tubes MGIT .
220959	Géloses inclinées BD BBL Middlebrook et Cohn 7H10, carton de 100.
295939	Bouillon BD BBL Middlebrook 7H9, 8 mL, coffret de 10 tubes.
221818	Sérum physiologique normal BD BBL , 5 mL, coffret de 10.
221819	Sérum physiologique normal BD BBL , 5 mL, carton de 100.
231729	BD BBL™ Taxo™ Differentiation Discs X, 50 disques par cartouche.

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

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com.

BD BBL MGIT

Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA Antibiotic Mixture

(Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, OADC-Anreicherung, PANTA-Antibiotisches Gemisch)

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, das bei Bedarf mit der **BBL MGIT** OADC-Anreicherung und dem **BBL MGIT PANTA**-Antibiotischen Gemisch angereichert werden kann, dient zum Nachweis und zur Isolierung von Mykobakterien. Geeignete Proben sind digestierte und dekontaminierte klinische Proben (außer Urin) und sterile Körperflüssigkeiten (außer Blut).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Zwischen 1985 und 1992 stieg die Zahl der gemeldeten MTB-Fälle um 18 %. Tuberkulose ist die führende infektionsbedingte Todesursache, da weltweit immer noch etwa 3 Millionen Menschen jährlich an dieser Erkrankung sterben.¹ Die zwischen 1981 und 1987 durchgeführten Untersuchungen von AIDS-Fällen zeigten, daß 5,5 % der Patienten mit AIDS disseminierte, nichttuberkulöse mykobakterielle Infektionen aufwiesen, wie z.B. MAC. Im Jahre 1990 war das kumulative Vorkommen durch die gestiegene Zahl der Fälle disseminierter nichttuberkulöser Infektionen mit Mykobakterien bereits auf 7,6 % angestiegen.² Sowohl der Wiederanstieg von MTB, als auch mehrfachresistente MTB (MDR-TB) stellen ein zunehmendes Problem dar. Laborseitige Verzögerungen bei der Kultivierung, Identifizierung und Meldung dieser MDR-TB-Fälle trugen zumindest teilweise zur Ausbreitung der Krankheit bei.³

Die U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) empfehlen, daß Labors alle Anstrengungen unternehmen, um die schnellsten verfügbaren Methoden zum diagnostischen Testen auf Mykobakterien einzusetzen. Diese Empfehlungen umfassen die Verwendung sowohl eines flüssigen als auch eines festen Mediums zur Kultivierung von Mykobakterien.³

Das **MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält 4 mL modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillonbasis.^{4,5} Das komplette, mit 0,5 mL OADC-Anreicherung und 0,1 mL **PANTA**-Antibiotischem Gemisch angereicherte Medium ist eines der am häufigsten verwendeten flüssigen Medien zur Kultivierung von Mykobakterien.

Alle klinischen Probentypen, pulmonale sowie extra-pulmonale Proben (außer Blut und Urin), können mit Hilfe konventioneller Methoden für die Primärisolierung im **MGIT**-Röhrchen vorbereitet werden.⁶ Die vorbereitete Probe wird in ein **MGIT**-Röhrchen inokuliert, inkubiert und ab dem zweiten Tag täglich unter einer Langwellen-UV-Lampe abgelesen. In positiven Röhrchen sind etwa 10^4 – 10^7 KBE/mL Mykobakterien vorhanden.

VERFAHRENSPRINZIP

Eingebettet in Silikon am Boden von 16 x 100-mm-Röhrchen mit rundem Boden befindet sich eine fluoreszierende Verbindung. Die fluoreszierende Verbindung spricht auf das Vorliegen von in der Bouillon aufgelöstem Sauerstoff an. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da die große Menge aufgelösten Sauerstoffs die Emissionen der Verbindung absorbiert. Später nehmen die aktiv respirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf, und die Fluoreszenz kann mit Hilfe eines UV-Durchleuchtungsgerätes bei 365 nm oder mit einer Langwellen-UV-Lampe (Wood-Lampe) beobachtet werden. Ein weiterer Hinweis auf Wachstum ist die Anwesenheit einer inhomogenen Trübung oder kleiner Körner oder Flocken im KulturmEDIUM.

Die Mediumkomponenten sind für das rasche Wachstum der Mykobakterien ausschlaggebend. Ölsäure wird von Tuberkelbazillen verwertet und spielt beim Stoffwechsel von Mykobakterien eine wichtige Rolle. Albumin agiert als Schutzmittel und verbessert die Isolierung von *Mycobacterium*-Spezies, indem es freie Fettsäuren bindet, die für diese toxisch sein können. Dextrose ist eine Energiequelle. Katalase zerstört eventuell im Medium vorkommende toxische Peroxide.

Durch Anreicherung der kombinierten **BBL MGIT**-Basis und **BBL MGIT** OADC-Anreicherung mit **BBL MGIT PANTA**-Antibiotischem Gemisch vor der Inokulation mit den klinischen Proben kann die Kontamination reduziert werden.

REAGENZILIEN

Das **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält: 110 µL Fluoreszenzindikator und 4 mL Bouillon. Der Indikator enthält Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid-Pentahydrat in Silikonkautschuk-Basis. Die Röhrchen sind mit 10%igem CO₂ ausgespült und mit Polypropylenkappen verschlossen.

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillonbasis	5,9 g
Casein-Pepton	1,25 g

BBL MGIT OADC enthält 15 mL Middlebrook OADC-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

Rinderalbumin	50,0 g	Katalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g	Ölsäure	0,6 g

Das **BBL MGIT PANTA**-Fläschchen enthält ein lyophilisiertes Gemisch von Bakterioostatika.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes **PANTA**

Polymyxin B	6.000 Einheiten	Trimethoprim	600 µg
Amphotericin B	600 µg	Azocillin	600 µg
Nalidixinsäure	2.400 µg		

*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Gebrauchsanleitung: Ein lyophilisiertes Fläschchen **MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch wird mit 3 mL sterilem, destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituiert.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen: Zur *In-Vitro*-Diagnostik.

Proben können pathogene Mikroorganismen, einschließlich Hepatitis B-Virus und HIV enthalten. Bei der Handhabung von mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Materialien allgemeine Vorsichtsmaßnahmen^{1,2} und örtliche Laborrichtlinien beachten.

Verfahren, die in Kultur gezüchtetes *Mycobacterium tuberculosis* beinhalten, müssen nach den Richtlinien und unter Anwendung der Sicherheitsvorrichtungen der Biologischen Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden.⁶

Vor Gebrauch muß jedes **MGIT**-Röhrchen auf Anzeichen von Kontamination oder Beschädigung untersucht werden. Fläschchen, die unbrauchbar erscheinen oder vor der Verwendung Fluoreszenz aufweisen, sind zu verwerfen.

Röhrchen, die auf den Boden gefallen sind, sollten sorgfältig auf Beschädigung untersucht werden. Bei Beschädigungen Röhrchen verwerfen.

Beim Beobachten der Fluoreszenz sollte eine UV-Schutzbrille getragen werden. Nur Langwellen-Beleuchtung verwenden (365 nm). KEINE KURZWELLEN-UV-BELEUCHTUNG ZUM ABLESEN DER RÖHRCHEN VERWENDEN.

Alle inokulierten **MGIT**-Röhrchen vor dem Verwerfen autoklavieren.

Aufbewahrung der Reagenzien: **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum – nach Erhalt bei 2–25 °C lagern. NICHT EINFRIEREN. Lichteinfall auf ein Minimum beschränken. Die Bouillon sollte klar und farblos sein. Bei Trübung nicht verwenden. **MGIT**-Röhrchen, die vor Gebrauch gemäß der Anleitung auf dem Etikett gelagert werden, können bis zum Verfallsdatum inokuliert und bis zu acht Wochen lang inkubiert werden.

BBL MGIT OADC – nach Erhalt im Dunkeln bei 2–8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor hellem Licht schützen.

BBL MGIT PANTA-Antibiotisches Gemisch – die lyophilisierten Fläschchen nach Erhalt bei 2–8 °C lagern. Nach der Rekonstitution kann das **PANTA**-Gemisch innerhalb von 72 h verwendet werden, sofern es bei 2–8 °C aufbewahrt wird, oder es kann bis zu 6 Monaten verwendet werden, wenn es bei mindestens -20 °C aufbewahrt wird. Nach dem Auftauen muß das **PANTA**-Gemisch sofort verwendet werden. Der nicht verwendete Anteil muß entsorgt werden.

PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Alle Proben sollten gemäß den Empfehlungen der CDC, dem *Clinical Microbiology Procedures Handbook* oder den Verfahrensvorschriften des jeweiligen Labors entnommen und transportiert werden.^{6,8}

DIGESTION, DEKONTAMINATION UND KONZENTRATION

Proben aus verschiedenen Körperstellen sollten wie folgt zur Inokulation von **MGIT**-Röhrchen verarbeitet werden:

SPUTUM: Proben sollten unter Anwendung des NALC-NaOH-Verfahrens gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*⁶ gegebenen Empfehlungen der CDC verarbeitet werden. Als Alternative kann der **BBL MycoPrep**-Kit zur Verarbeitung von Mykobakterienproben verwendet werden (siehe "Lieferbare Produkte").

MAGENASPIRATE: Die Proben sollten auf die gleiche Art und Weise wie Sputum dekontaminiert werden. Wenn das Probenvolumen mehr als 10 mL beträgt, durch Zentrifugieren konzentrieren. Das Sediment in ca. 5 mL sterilem Wasser resuspendieren und dann dekontaminieren. Eine kleine Menge NALC-Pulver (50 – 100 mg) hinzufügen, falls die Probe dickflüssig oder schleimähnlich ist. Die Probe nach der Dekontamination und vor der Inokulierung in das **MGIT**-Röhrchen erneut konzentrieren.

KÖRPERFLÜSSIGKEITEN (Liquor, Synovialflüssigkeit, Pleuralflüssigkeit, etc.): Proben, die aseptisch entnommen wurden und bei denen kein Verdacht auf das Vorkommen von anderen Bakterien vorliegt, können ohne Dekontamination inokuliert werden. Wenn das Probenvolumen mehr als 10 mL beträgt, durch 15-min Zentrifugieren bei 3.000 x g konzentrieren. Die Überstandsflüssigkeit abgießen. Das **MGIT**-Röhrchen mit dem Sediment inokulieren. Proben, die wahrscheinlich andere Bakterien enthalten, müssen dekontaminiert werden.

GEWEBE: Gewebeprobe sollten gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*⁶ gegebenen Empfehlungen der CDC verarbeitet werden.

STUHL: 1 g Fäzes in 5 mL Middlebrook-Bouillon suspendieren. Suspension 5 Sek. im Vortex-Mixer mischen. Die weitere Verarbeitung sollte unter Anwendung des NALC-NaOH-Verfahrens gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*⁶ gegebenen Empfehlungen der CDC erfolgen.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, 4 mL, Packung mit je 25 und 100 Röhrchen oder **BBL MGIT OADC**, 6 Fläschchen, 15 mL oder **BBL MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch, 6 lyophilisierte Fläschchen (s. "Lieferbare Produkte").

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Falcon 50-mL-Zentrifugenröhrchen, 4%iges Natriumhydroxid, 2,9%ige Natriumcitratlösung, N-Acetyl-L-Cystein-Pulver, Phosphatpuffer mit pH 6,8, Vortex-Mixer, Inkubator (37 °C), sterile 1-mL-Pipetten, sterile Transferpipetten, UV-Durchleuchtungsgerät (365 nm) oder Wood-Lampe mit Langwellen-Glühbirne oder UV-Licht, 0,4%ige Natriumsulfatlösung (Verfahren unten), **BBL** Middlebrook und Cohn 7H10 Agar, **BBL MycoPrep**, **BBL** Middlebrook 7H9-Bouillon (s. "Lieferbare Produkte") oder

anderes Agar- oder Eiermedium für Mykobakterien. Gewebemogenisator oder steriler Tupfer, **BBL** Normale Kochsalzlösung (s. "Lieferbare Produkte"), Mikroskop und Materialien zum Färben der Objektträger, 100-µL- und 500-µL-Pipetten, dazupassende Pipettenspitzen, 5%ige Schafblut-Agarplatte, Eye Guard Augenschutzbrille (UVP Nr. UVC-303, San Gabriel, CA, USA) und Tuberkelbazillen-Desinfektionsmittel.

Inokulierung der MGIT-Röhrchen:

1. Das **MGIT**-Röhrchen mit der Probennummer beschriften.
2. Die Kappe entfernen und aseptisch 0,5 mL **MGIT** OADC hinzufügen.
3. Aseptisch 0,1 mL rekonstituiertes **MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch hinzufügen. Um beste Ergebnisse zu erzielen, sollten OADC-Anreicherung und **PANTA**-Antibiotisches Gemisch erst unmittelbar vor der Inokulierung hinzugefügt werden.
4. 0,5 mL der vorbereiteten konzentrierten Probensuspension hinzufügen. Außerdem einen Tropfen (0,1 mL) der Probe auf eine 7H10-Agarplatte oder einen anderen festen Agar oder Eiernährboden für Mykobakterien geben. *HINWEIS: Probenvolumina größer als 0,5 mL können die Kontamination erhöhen oder die Leistung des Tests anderweitig beeinträchtigen.*
5. Das Röhrchen wieder fest verschließen und gut durchmischen.
6. Die Röhrchen bei 37 °C inkubieren.

Wenn Mykobakterien mit unterschiedlichem Inkubationsbedarf in einer Probe vermutet werden, kann ein zweites **MGIT**-Röhrchen vorbereitet und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert werden (z.B. 30 °C oder 42 °C). Die Röhrchen inokulieren und bei der erforderlichen Temperatur inkubieren.

Wenn in einer Probe *Mycobacterium haemophilum* vermutet wird, muß bei der Inokulierung eine Hämiquelle hinzugefügt und das Röhrchen bei 30 °C inkubiert werden. Jedem **MGIT**-Röhrchen, das vor der Inokulierung mit Probenmaterial die Zugabe von Häm in erfordert, aseptisch ein Blättchen **BBL Taxo** Differentiation Discs X zugeben (s. "Lieferbare Produkte").

7. Die Ergebnisse täglich gemäß dem Verfahren "Ablesen der Röhrchen" ablesen, wobei am zweiten Tag der Inkubation begonnen wird.

Vorbereitung der Röhrchen mit negativer und positiver Kontrolle zur Auswertung: Die negativen und positiven Kontrollen dienen lediglich zur Auswertung der Fluoreszenz und sind nicht als Kontrolle für die Leistungsfähigkeit der Medien gedacht.

Röhrchen mit positiver Kontrolle:

1. Die Bouillon aus einem nicht inokulierten **MGIT**-Röhrchen gießen.
2. Das Röhrchen als positive Kontrolle beschriften und das Datum vermerken.
3. 0,4%ige Natriumsulfatlösung vorbereiten (0,4 g in 100 mL sterilem, destilliertem oder deionisiertem Wasser). Der nicht verwendete Anteil muß entsorgt werden.
4. 5 mL Natriumsulfatlösung in das Röhrchen geben, fest verschließen und vor Gebrauch mindestens 1 h lang bei Raumtemperatur stehen lassen.
5. Die Röhrchen für die positive Kontrolle können mehrfach verwendet werden. Jedes Röhrchen mit positiver Kontrolle kann bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur bis zu vier Wochen lang verwendet werden.

Röhrchen mit negativer Kontrolle: Ein ungeöffnetes, nicht inokuliertes **MGIT**-Röhrchen wird als Kontrolle verwendet.

Ablesen der Röhrchen:

1. Für die korrekte Auswertung der Testergebnisse ist das Mitführen einer positiven und einer negativen Kontrolle unerlässlich.
2. Die Röhrchen aus dem Inkubator nehmen und auf das UV-Licht neben ein Röhrchen mit positiver Kontrolle und ein nicht inokuliertes Röhrchen (negative Kontrolle) stellen. Es wird empfohlen, immer ein Gestell (4 x 10 Röhrchen) auf das UV-Licht zu stellen. *HINWEIS: Beim Beobachten der Fluoreszenz sollte eine UV-Schutzbrille getragen werden. Vorzugsweise sollte bei normaler Zimmerbeleuchtung gearbeitet werden. Das Ablesen der Röhrchen in einem Raum mit direktem Sonnenlicht oder unter gedämpfter Beleuchtung ist zu vermeiden.*
3. Visuell feststellen, welche **MGIT**-Röhrchen helle Fluoreszenz aufweisen. Die Fluoreszenz zeigt sich als hell-orange Farbe am Boden des Röhrchens und als orange Reflektion am Meniskus. Das **MGIT**-Röhrchen sollte dann aus dem Gestell genommen werden und mit den Röhrchen zur positiven bzw. negativen Kontrolle verglichen werden. Die positive Kontrolle sollte sehr starke Fluoreszenz aufweisen (sehr starke orange Farbe). Die negative Kontrolle sollte sehr wenig oder gar keine Fluoreszenz aufweisen. Wenn die Fluoreszenz im **MGIT**-Röhrchen der positiven Kontrolle gleicht, ist das Röhrchen positiv. Gleicht sie eher der negativen Kontrolle, so ist es negativ. Wachstum kann ebenfalls anhand von inhomogener Trübung, kleinen Körnern oder Flocken im Kulturmedium nachgewiesen werden.
4. Von den positiven Röhrchen sollte ein Ausstrich für eine Säurefestigkeitsfärbung angefertigt werden. Röhrchen mit negativem Ausstrich sollten auf bakterielle Kontamination untersucht werden. Für Subkulturen zur Identifizierung und Durchführung von Arzneimittelempfindlichkeitstests kann Flüssigkeit aus dem **BBL MGIT**-Röhrchen verwendet werden.
5. Negative Röhrchen sollten je nach Probentyp und Erfahrung des Labors acht Wochen lang oder länger weiterhin täglich abgelesen werden. Es können auch alternative Zeitpläne zum Ablesen aufgestellt werden. Werden die Röhrchen einige Tage, z.B. an Wochenenden oder Feiertagen, nicht abgelesen, so kann dies den Nachweis von positiven Röhrchen verzögern, die Leistung der Medien wird jedoch ansonsten nicht beeinträchtigt. Vor dem Verwerfen sollten die Röhrchen visuell auf das Auftreten von Trübung oder kleinen Körnern untersucht werden. Negative **MGIT**-Röhrchen können nicht wiederverwendet werden. Bei Verdacht auf Mykobakterienwachstum das unter "Verarbeitung eines positiven **MGIT**-Röhrchens" beschriebene Verfahren durchführen.

Erneute Verarbeitung kontaminierter MGIT-Röhrchen: Kontaminierte **MGIT**-Röhrchen können unter Verwendung desselben Verfahrens, das zur erstmaligen Probenverarbeitung verwendet wurde, erneut dekontaminiert und konzentriert werden.

1. Den Inhalt des kontaminierten **MGIT**-Röhrchens in ein 50-mL-Zentrifugenröhrchen (Plastik) geben.
2. Dem Zentrifugenröhrchen 5 mL NALC-NaOH zugeben. Die Kappe fest aufsetzen und das Röhrchen 5 – 20 Sek. auf dem Vortex mischen.
3. Das Röhrchen 15 – 20 min stehen lassen. Die Behandlung der Probe sollte 20 min nicht überschreiten.
4. 35 mL sterilen Phosphatpuffer (pH 6,8) hinzugeben. Kappe wieder aufsetzen und den Inhalt gründlich mischen.
5. Die Probe in einer Zentrifuge bei einer Geschwindigkeit von 3.000 x g 15 min lang konzentrieren.
6. Die Überstandslösung vorsichtig vom Sediment abgießen. Das Sediment mit Hilfe einer sterilen Pasteur-Pipette in Phosphat-Puffer (pH 6,8) resuspendieren.
7. 0,5 mL der Suspension in ein neues **MGIT**-Röhrchen inokulieren.

Qualitätskontrolle durch den Anwender: Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Anwendern wird geraten, die relevanten CLSI-Richtlinien und CLIA-Vorschriften über geeignete Maßnahmen zur Qualitätskontrolle einzusehen.

Qualitätskontrollzertifikate sind auf der BD-Website verfügbar. In den Qualitätskontrollzertifikaten sind Testorganismen, einschließlich der im CLSI zugelassenen Standard M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*, spezifizierten ATCC-Kulturen, aufgeführt.⁹

HINWEIS: Middlebrook 7H9-Bouillon (ergänzt) ist gemäß CLSI M22-A3 von Qualitätskontrolltests durch den Anwender ausgenommen.⁹

ERGEBNISSE

Fluoreszenz, inhomogene Trübung, kleine Körner oder Flocken in einem inokulierten **MGIT**-Röhrchen sind Anzeichen für eine positive Kulturprobe. Von positiven Röhrchen sollte eine Subkultur angelegt und ein Ausstrich für eine Säurefestigkeitsfärbung angefertigt werden. Eine positive Säurefestigkeitsfärbung indiziert die präsumtive Gegenwart lebensfähiger Mikroorganismen im Röhrchen.

Verarbeitung eines positiven **MGIT**-Röhrchens:

HINWEIS: Alle Schritte sollten in einer biologischen Sicherheitswerkbank ausgeführt werden.

- a) **MGIT**-Röhrchen vom Gestell nehmen.
- b) Mit Hilfe einer sterilen Transferpipette ein Aliquot (etwa 0,1 mL) vom Boden des Röhrchens zur Anfertigung von Färbungen entnehmen (Säurefestigkeitsfärbung und Gram-Färbung).
- c) Ausstrich und Färbung prüfen. Vorläufige Ergebnisse erst nach Beurteilung der Säurefestigkeitsfärbung dokumentieren.

Bei positiver Säurefestigkeitsfärbung eine Subkultur auf festem Medium anlegen und wie folgt dokumentieren: Wachstum positiv, Säurefestigkeitsfärbung positiv, Identifizierung ausstehend.

Wenn andere Mikroorganismen als säurefeste Bakterien vorhanden sind, wie folgt dokumentieren: Wachstum positiv, Säurefestigkeitsfärbung negativ, kontaminiert.

Wenn keine Mikroorganismen vorhanden sind, ist kein Ergebnis zu dokumentieren. Die Bouillon auf Blutagar und Kulturmedium für Mykobakterien subkultivieren; den Ausstrich unter Zusatz von Protein wiederholen, um sicherzustellen, daß das Inokulum fest am Objektträger haftet.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die Isolierung von Mykobakterien im **MGIT**-Röhrchen hängt von der Anzahl der in der Probe vorhandenen Organismen, der Probenentnahmemethode, patientenbedingten Faktoren (z.B. das Vorhandensein von Symptomen oder vorhergehende Behandlungen) und der Verarbeitungsmethode ab.

Zur Dekontamination wird die NALC-NaOH-Methode (N-Acetyl-L-Cystein mit Natriumhydroxid) oder die Oxalsäure-Methode empfohlen. Andere Dekontaminationsverfahren wurden mit dem **BBL MGIT**-Medium bisher noch nicht getestet. Digestions-/Dekontaminationsmittel können das Mykobakterienwachstum beeinträchtigen.

Koloniemorphologie und Färbeverhalten können nur auf festen Medien ermittelt werden. Die Säurefestigkeit von Mykobakterien kann abhängig vom Stamm, dem Alter der Kultur und anderen Variablen unterschiedlich sein. Die Konstanz mikroskopischer Morphologie in **BBL MGIT**-Medium wurde bisher noch nicht ermittelt.

Ein in der Säurefestigkeitsfärbung positiver Ausstrich eines **MGIT**-Röhrchens kann zur Isolierung für Identifizierungs- und Empfindlichkeitstests sowohl auf selektiven als auch nicht-selektiven Medien für Mykobakterien subkultiviert werden.

MGIT-Röhrchen, die positiv erscheinen, können neben Mykobakterien Begleitkeime enthalten. Begleitkeime können vorhandene Mykobakterien überwachsen. Solche **MGIT**-Röhrchen sollten erneut dekontaminiert und kultiviert werden.

MGIT-Röhrchen, die positiv erscheinen, können mehrere Spezies von Mykobakterien enthalten. Schneller wachsende Mykobakterien können vor langsamer wachsenden Mykobakterien Fluoreszenz entwickeln; daher ist es wichtig, eine Subkultur positiver **MGIT**-Röhrchen anzulegen, um alle in der Probe vorhandenen Mykobakterien korrekt zu identifizieren.

Probenvolumina von über 0,5 mL können die Kontamination erhöhen oder die Leistungsfähigkeit der **MGIT**-Röhrchen anderweitig beeinflussen.

Da die **MGIT**-Bouillon sehr wachstumsfördernd und der **MGIT**-Indikator nicht selektiv ist, müssen die angegebenen Verfahren zur Digestion/Dekontamination unbedingt eingehalten werden, um die Möglichkeit einer Kontamination zu verringern. Die Beachtung der Verfahrensanleitungen ist für eine optimale Isolierung von Mykobakterien äußerst wichtig.

Die Verwendung des **PANTA**-Antibiotischen Gemischs ist zwar für alle nicht-sterilen Proben unerlässlich, kann jedoch das Wachstum einiger Mykobakterien hemmen.

Abschließende Subkulturen wurden im Verlauf der klinischen Studien nicht routinemäßig angelegt. Daher kann zu diesem Zeitpunkt die Zahl falsch-negativer Ergebnisse (d.h., **MGIT**-Röhrchen, die im Verlauf der achtwöchigen Inkubationszeit negativ blieben, subkultiviert wurden und dann mykobakterielles Wachstum aufwiesen) nicht genau angegeben werden.

Studien mit beimpften Kulturen wurden unter Verwendung von dreiundzwanzig Mykobakterienspezies (mit ATCC-Stämmen und Wildstämmen) durchgeführt. Dabei wurden Inokulumkonzentrationen von 10³ und 10⁵ KBE/mL verwendet. Die folgenden Spezies wurden im **MGIT**-Röhrchen nachgewiesen:

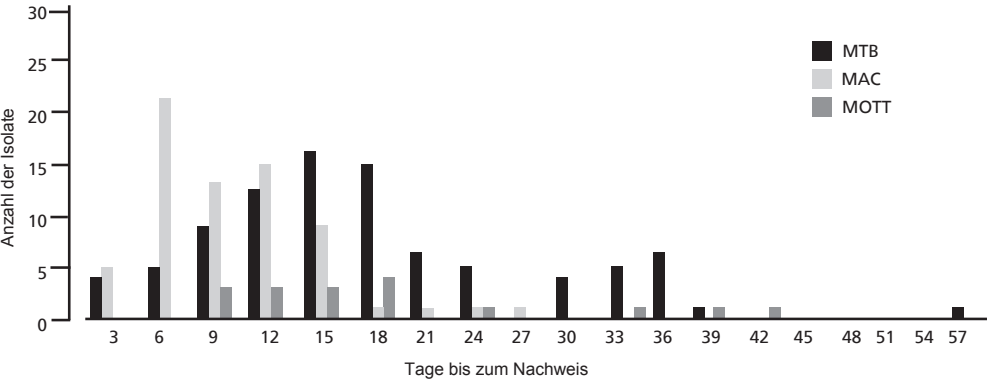
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavescens</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Bei der klinischen Beurteilung des **MGIT**-Röhrchens isolierte Spezies.

Klinische Studien belegten die Isolierung von Mykobakterien aus Proben der Atemwege, aus Magenaspирaten, Gewebe, Stuhl und sterilen Körperflüssigkeiten (außer Blut); die Isolierung von Mykobakterien aus anderen Körperflüssigkeiten wurde mit diesem Produkt noch nicht nachgewiesen.

ERWARTETE WERTE

Abbildung 1 – Die folgende Abbildung zeigt die Häufigkeitsverteilung der Isolierungszeit bei den im MGIT-System positiven Studienproben.



LEISTUNGSMERKMALE

Das **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum wurde an sechs klinischen Zentren, darunter öffentliche Gesundheitslabors und große Notfallkrankenhäuser an geographisch unterschiedlichen Standorten, beurteilt. Die Patientenpopulation der Zentren umfaßte HIV-infizierte und immungeschwächte Patienten und Transplantatempfänger. Die **BBL MGIT**-Röhrchen wurden mit dem radiometrischen **BACTEC** 460TB-System, dem **BBL SEPTI-CHEK** AFB-Kultursystem für Mykobakterien und konventionellen festen Wachstumsmedien zum Nachweis und zur Isolierung von Mykobakterien aus klinischen Proben (außer Blut und Urin) verglichen. Im Verlauf der Studie wurden insgesamt 2.801 Proben getestet. Die Anteile der getesteten Proben nach Entnahmestelle waren: Atemwege (78 %), Magen (0,4 %), Körperflüssigkeiten (9,8 %), Gewebe (7,0 %), Stuhl (2,5 %) und andere (2,4 %). Insgesamt waren 318 Proben positiv, die 330 während der Studie gewonnene Isolate repräsentierten. Von diesen 330 Isolaten wurden 253 (77 %) mit Hilfe der **BBL MGIT**-Röhrchen, 260 (79 %) mit dem **BACTEC** 460TB-System und dem **BBL SEPTI-CHEK** AFB-Medium und 219 (66 %) mit konventionellen festen Medien isoliert. Der Anteil falsch-positiver Ergebnisse (**MGIT**-Fluoreszenz, keine säurefesten Bakterien vorhanden) bei den **BBL MGIT**-Röhrchen betrug 0,5 %. Die **BBL MGIT**-Röhrchen wiesen 3,7 % der Isolate nicht nach, die in einem oder mehreren anderen Bezugsmedium isoliert wurden (**BACTEC** 460TB, **BBL SEPTI-CHEK** AFB-Medium oder konventionelle feste Medien). Während dieser Prozentsatz einen potentiellen Nachweisverlust darstellt, weist dies nicht auf falsch-negative Ergebnisse hin (siehe "Verfahrensbeschränkungen"). Die Verwendung eines zweiten Mediums erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Isolierung von Mykobakterien. Die durchschnittliche Durchbruch-Kontaminationsrate bei den **BBL MGIT**-Röhrchen betrug 9,7 %.

BACTEC-ZENTREN

Tabelle 2 - Nachweis von Mykobakterien-Isolaten bei klinischen Beurteilungen

Isolat	Gesamtzahl der Isolate	Gesamtzahl MGIT	Nur MGIT	Gesamtzahl BACTEC	Nur BACTEC	Gesamtzahl KONV.	Nur KONV.
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
M. kansasii	5	2	0	5	1	4	0
M. fortuitum	9	5	3	3	1	5	3
M. chelonae	2	0	0	2	1	1	0
M. xenopi	2	0	0	2	2	0	0
M. simiae	1	1	0	1	0	0	0
M. gordonae	11	4	1	4	1	9	5
M. flavescens	2	1	0	2	1	0	0
Alle MYCO	244*	180*	15*	203	27	168	17

***HINWEIS:** Vierzehn der NUR durch **MGIT** nachgewiesenen Isolate sind in diesen Daten nicht enthalten. Die präsumtive Identifizierung erfolgte ohne abschließende Bestätigung der Identität.

SEPTI-CHEK-ZENTREN

Tabelle 3 - Nachweis von Mykobakterien-Isolaten bei klinischen Beurteilungen

Isolat	Gesamtzahl der Isolate	Gesamtzahl MGIT	Nur MGIT	Gesamtzahl SEPTI-CHEK	Nur SEPTI-CHEK	Gesamtzahl KONV.	Nur KONV.
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
M. kansasii	1	1	1	0	0	0	0
M. gordonae	2	2	2	0	0	0	0
Alle MYCO	67*	54*	9*	57	4	51	0

***Hinweis:** Fünf der NUR durch **MGIT** nachgewiesenen Isolate sind in diesen Daten nicht enthalten. Die präsumtive Identifizierung erfolgte ohne abschließende Bestätigung der Identität.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
245111	BD BBL MGIT -Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, 4 mL, Karton mit 25 Röhrchen.
245113	BD BBL MGIT -Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, 4 mL, Karton mit 100 Röhrchen.
245116	BD BBL MGIT OADC, 15 mL, Karton mit 6 Fläschchen. Jedes Fläschchen reicht für 25 MGIT -Röhrchen aus.
220908	BD BBL Löwenstein-Jensen-Schrägagar, Packung mit 10 Stück (20 x 148 mm Röhrchen mit Kappe).
220909	BD BBL Löwenstein-Jensen-Schrägagar, Karton mit 100 Stück (20 x 148 mm Röhrchen mit Kappe).
240862	BD BBL MycoPrep Aufschluß-/Dekontaminationskit für Proben, zehn 75-mL-Fläschchen mit NALC-NaOH-Lösung und 5 Packungen mit Phosphatpuffer.
240863	BD BBL MycoPrep Aufschluß-/Dekontaminationskit für Proben, zehn 150-mL-Fläschchen mit NALC-NaOH-Lösung und 10 Packungen mit Phosphatpuffer.
245114	BD BBL MGIT PANTA -Antibiotisches Gemisch, lyophilisiert, Karton mit 6 Fläschchen. Jedes Fläschchen reicht für 25 MGIT -Röhrchen aus.
220959	BD BBL Middlebrook und Cohn 7H10 Schrägagar, Karton mit 100.
295939	BD BBL Middlebrook 7H9-Bouillon, 8 mL, Packung mit 10 Röhrchen.
221818	BD BBL Normale Kochsalzlösung, 5 mL, Packung mit 10.
221819	BD BBL Normale Kochsalzlösung, 5 mL, Karton mit 100.
231729	BD BBL Taxo Differentiation Discs X, 50 Blättchen pro Kartusche.

LITERATURNACHWEIS: S. "References" im englischen Text.

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder www.bd.com.



BD BBL MGIT

Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA Antibiotic Mixture

(Provetta indicatore di crescita di micobatteri, arricchimento OADC, miscela antibiotica PANTA)

Italiano

USO PREVISTO

La provetta **BBL MGIT**, indicatore della crescita dei Micobatteri, addizionata, quando opportuno, con il supplemento OADC **BBL MGIT** e con la miscela antibiotica **PANTA BBL MGIT**, è indicata per la rilevazione e l'isolamento dei Micobatteri. I tipi di campioni che si prestano a tale dosaggio sono i campioni clinici digeriti e decontaminati (ad eccezione delle urine) e i liquidi biologici sterili (ad eccezione del sangue).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Tra il 1985 e il 1992 il numero dei casi accertati di MTB è aumentato del 18%. Si ritiene che la tubercolosi sia tuttora causa di morte, nel mondo, per circa 3 milioni di persone all'anno, cifra che la pone al primo posto tra le malattie infettive letali.¹ Tra il 1981 e il 1987, un controllo dei casi di AIDS fece rilevare che il 5,5% dei pazienti affetti da AIDS aveva contratto infezioni micobatteriche diverse dalla tubercolosi, es. il MAC. Entro il 1990 i casi riscontrati di infezioni micobatteriche diverse dalla tubercolosi erano aumentati fino ad avere un'incidenza globale del 7,6%.² Preoccupazione crescente è stata causata, oltre che dalla ripresa dell'MTB, dall'apparizione dell'MTB resistente a molteplici farmaci (MDR-TB). I ritardi di laboratorio nell'identificare e diagnosticare questi casi di MDR-TB hanno contribuito almeno in parte alla diffusione della malattia.³

Gli U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) hanno esteso ai laboratori la raccomandazione di fare il possibile per adottare i metodi più rapidi a disposizione per l'analisi diagnostica dei Micobatteri. Tali raccomandazioni comprendono l'utilizzo di un terreno liquido e di uno solido per la coltura di Micobatteri.³

La provetta **MGIT**, indicatore di crescita dei Micobatteri, contiene 4 mL di Brodo base Middlebrook 7H9 modificato.^{4,5} Il terreno completo, con 0,5 mL di supplemento OADC e 0,1 mL di miscela antibiotica **PANTA**, è uno dei brodi più comunemente usati per la coltura dei Micobatteri.

Qualsiasi tipo di campione clinico, sia polmonare che extra-polmonare (ad eccezione di sangue e urine), può venir sottoposto a trattamento per l'isolamento primario nella provetta **MGIT**, con l'utilizzo dei metodi tradizionali.⁶ Il campione trattato viene inoculato in una provetta **MGIT**, incubato e si esegue la lettura giornaliera a partire dal secondo giorno di incubazione, usando una lampada UV a onde lunghe. Allorché la provetta viene riscontrata positiva, i micobatteri presenti corrispondono a circa 10⁴ – 10⁷ UFC/mL.

PRINCIPI DEL PROCEDIMENTO

Un composto fluorescente è incapsulato nel silicone posto sul fondo delle provette circolari da 16 x 100 mm. Il composto fluorescente è sensibile alla presenza dell'ossigeno disciolto nel brodo. All'inizio, la grande quantità di ossigeno contenuto nel terreno riduce le emissioni del composto e si nota solo una debole fluorescenza. In un secondo tempo, i microrganismi che respirano attivamente l'ossigeno permettono di osservare la fluorescenza usando un transilluminatore UV da 365 nm o una lampada UV ad onde lunghe (lampada di Wood). La crescita può anche essere rilevata dalla presenza di torbidità non omogenea o di piccoli coaguli nel brodo di coltura.

I componenti del brodo di coltura sono sostanze essenziali per la crescita rapida dei Micobatteri. L'acido oleico viene utilizzato dai bacilli della tubercolosi e riveste un ruolo importante nel metabolismo dei Micobatteri. L'albumina agisce quale agente protettivo legando gli acidi grassi liberi, tossici per le specie *Mycobacterium*, favorendo così il loro recupero. Il destrosio è una fonte di energia. La catalasi distrugge i perossidi tossici che potrebbero essere presenti nel terreno di coltura.

La contaminazione può essere ridotta arricchendo il brodo di coltura, composto dalla base **BBL MGIT** e il supplemento OADC **BBL MGIT**, con la miscela antibiotica **PANTA BBL MGIT**, prima dell'inoculo del campione clinico.

REAGENTI

Le provette **BBL MGIT**, indicatori della crescita di Micobatteri, contengono: 110 µL di indicatore fluorescente e 4 mL di brodo di coltura. L'indicatore contiene, in una base di gomma al silicone, Tris 4,7-difenil-1,10-fenantroline cloruro di rutenio pentaidrato. Le provette contengono CO₂ al 10% e sono chiuse con tappi di polipropilene.

Formula approssimata* per L d'acqua purificata

Brodo Middlebrook 7H9 modificato	5,9 g
Peptone di caseina	1,25 g

La provetta OADC **BBL MGIT** contiene 15 mL di supplemento OADC Middlebrook.

Formula approssimata* per L d'acqua purificata

Albumina bovina.....	50,0 g	Catalasi.....	0,03 g
Destrosio.....	20,0 g	Acido oleico.....	0,6 g

La fiala **PANTA BBL MGIT** contiene una miscela liofilizzata di agenti antimicrobici.

Formula approssimata* per fiala di **PANTA** liofilizzato

Polimixina B.....	6.000 unità	Trimethoprim.....	600 µg
Anfotericina B.....	600 µg	Azlocillina.....	600 µg
Acido nalidixico.....	2.400 µg		

*Corretta e/o integrata per soddisfare i criteri di rendimento.

Istruzioni per l'uso: Ricostituire una fiala liofilizzata di miscela antibiotica **PANTA MGIT** con 3 mL di acqua distillata o deionizzata sterile.

Avvertenze e precauzioni: Per uso diagnostico *in vitro*.

Dei microrganismi patogeni incluso il virus dell'epatite B e il virus dell'immunodeficienza umana possono essere presenti nei campioni. Si raccomanda di osservare le precauzioni accettate universalmente^{1,2} e le norme del laboratorio locale quando viene maneggiato qualsiasi oggetto contaminato con sangue o con altri fluidi biologici.

Quando si lavora con una cultura di *Mycobacterium tuberculosis*, si richiedono le pratiche di sicurezza biologica di livello 3 e tutte le apparecchiature e attrezzature adatte al caso.⁶

Prima dell'uso, esaminare ogni provetta **MGIT** per assicurarsi che non vi sia traccia di contaminazione o danneggiamento. Eliminare tutte le provette non intatte o che presentano fluorescenza prima dell'uso.

Esaminare bene ogni provetta caduta inavvertitamente ed eliminarla in caso abbia subito qualche danno.

Portare occhiali protettivi UV quando si osserva la fluorescenza e usare solamente luce a onde lunghe (365 nm). **NON USARE LAMPADE UV A ONDE CORTE.**

Sterilizzare in autoclave tutte le provette **MGIT** inoculate prima di eliminarle.

Conservazione dei reagenti: Provette **BBL MGIT** indicatori della crescita di Micobatteri – Al ricevimento, conservare a una temperatura di 2 – 25 °C. **NON CONGELARE.** Minimizzare l'esposizione alla luce. Il brodo di coltura deve essere limpido e incolore. Non usare se torbido. Le provette **MGIT** conservate secondo le indicazioni fino al momento dell'uso possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per un periodo massimo di otto settimane.

OADC **BBL MGIT** – Al ricevimento, conservare al buio a una temperatura di 2–8 °C. Evitare congelamento o riscaldamento. Non aprire fino al momento dell'uso. Minimizzare l'esposizione alla luce.

Miscela antibiotica **PANTA BBL MGIT** – Al ricevimento, conservare le fiale liofilizzate a una temperatura di 2–8 °C. Una volta ricostituita, la miscela **PANTA** va usata nell'arco di 72 h, se conservata a temperatura di 2–8 °C, oppure entro 6 mesi se conservata a temperatura di -20 °C o inferiore. Una volta scongelata, la miscela **PANTA** deve essere usata immediatamente. Eliminare la porzione non utilizzata.

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Tutti i campioni devono essere prelevati e trasportati secondo le modalità stabilite dal CDC, dal *Clinical Microbiology Procedures Handbook* o dal regolamento in vigore presso il laboratorio locale.^{6,8}

DIGESTIONE, DECONTAMINAZIONE E CONCENTRAZIONE

I campioni provenienti dalle diverse parti del corpo, per l'inoculo con il Sistema **MGIT**, devono essere trattati come segue:

ESPETTORATO: I campioni devono venir trattati con il procedimento che usa NALC-NaOH secondo la procedura del CDC contenuta nel *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶ Come alternativa, si può usare il kit **BBL MycoPrep** per il trattamento di campioni micobatterici (vedere "Disponibilità").

ASPIRATO GASTRICO: I campioni devono essere decontaminati, come fatto per l'espettorato. Se il volume del campione è superiore a 10 mL, concentrarlo con centrifuga. Sospendere di nuovo il sedimento in circa 5 mL d'acqua sterile e quindi decontaminare. Se il campione è denso o mucoide, aggiungere una piccola quantità di NALC in polvere (50 – 100 mg). Dopo la decontaminazione, procedere ancora alla concentrazione prima dell'inoculo nella provetta **MGIT**.

LIQUIDI CORPOREI (LCS, liquido sinoviale, liquido pleurico, ecc.): I campioni raccolti sterilmente e che si pensa non contengano altri batteri, possono essere inoculati senza previa decontaminazione. Se il volume del campione supera i 10 mL, concentrare in centrifuga a 3.000 x g per 15 min. Eliminare il supernatante. Inoculare il sedimento nella provetta **MGIT**. I campioni che si prevede contengano altri batteri devono essere decontaminati.

TESSUTO: I campioni di tessuto devono essere trattati secondo la procedura raccomandata dal CDC e contenuta nel *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

CAMPIONI FECALI: Sospendere 1 g di feci in 5 mL di Brodo Middlebrook. Centrifugare la sospensione in un vortex per 5 sec. Procedere usando NALC-NaOH come raccomandato dal CDC in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.⁶

PROCEDURA

Materiali forniti: Provette **BBL MGIT** indicatori della crescita di Micobatteri, in confezioni da 25 e 100 provette da 4 mL, o OADC **BBL MGIT**, 6 fiale liofilizzate da 15 mL, o miscela antibiotica **PANTA BBL MGIT**, 6 fiale liofilizzate (vedere "Disponibilità").

Materiali necessari ma non forniti: Provette per centrifuga da 50 mL **Falcon**, idrossido di sodio al 4%, soluzione di citrato di sodio al 2,9%, polvere di N-acetil-L-cisteina, tampone fosfato pH 6,8, vortex, incubatore a 37 °C, pipette sterili da 1 mL, pipette sterili da trasporto, transilluminatore a raggi UV (365 nm) o lampada di Wood a onde lunghe o a luci nere, soluzione di solfito di sodio allo 0,4% (vedere procedura di seguito), agar **BBL** Middlebrook e Cohn 7H10, **BBL MycoPrep**, Brodo **BBL** Middlebrook 7H9 (vedere "Disponibilità") o altri agar o terreni a base d'uovo per Micobatteri. Omogeneizzatore di tessuti o bastoncino sterile, soluzione salina normale **BBL** (vedere "Disponibilità"), microscopio e materiali per la colorazione di vetrini, pipette da 100 µL e da 500 µL e relativi puntali, piastra agar con sangue di montone al 5%, occhiali di protezione Eye Guard (UVP N° UVC-303, San Gabriel, CA, USA) e disinfettanti idonei.

Inoculo delle provette MGIT:

1. Contrassegnare la provetta **MGIT** col numero del campione.
2. Svitare il tappo e aggiungere sterilmente 0,5 mL di OADC **MGIT**.
3. Aggiungere sterilmente 0,1 mL di miscela antibiotica **PANTA MGIT** ricostituita. Per ottenere risultati ottimali, l'aggiunta del supplemento OADC e della miscela antibiotica **PANTA** dovrebbe avvenire immediatamente prima dell'inoculo del campione.
4. Aggiungere 0,5 mL della sospensione concentrata del campione preparata in precedenza. Distribuire anche una goccia di campione (0,1 mL) su una piastra agar 7H10, o altro agar solido o terreni a base d'uovo per Micobatteri. *NOTA: Volumi di campione superiori a 0,5 mL aumentano i rischi di contaminazione o in ogni caso influenzano in senso negativo la performance delle provette.*

5. Riavvitare bene il tappo e miscelare accuratamente.

6. Incubare la provetta a 37 °C.

Per i campioni in cui si sospetta la presenza di Micobatteri con esigenze di incubazione diverse, preparare un duplicato della provetta **MGIT** e incubarlo alla temperatura richiesta, es. 30 °C o 42 °C. Inoculare e incubare alla temperatura idonea.

Se si sospetta che un campione possa contenere *Mycobacterium haemophilum*, si deve introdurre nella provetta una sostanza contenente emina al momento dell'inoculo e poi incubare la provetta a 30 °C. Usando una tecnica sterile, porre un disco di **BBL Taxo** Differentiation Discs X in ogni provetta **MGIT** che richiede l'aggiunta di emina, prima di inoculare il campione (vedere "Disponibilità").

7. Leggere i risultati quotidianamente a partire dal secondo giorno di incubazione, seguendo il procedimento descritto nella voce "Lettura dei risultati delle provette".

Preparazione delle provette per il controllo d'interpretazione Positivo e Negativo: L'uso delle provette per il Controllo Positivo e Negativo è previsto solo per l'interpretazione della fluorescenza e non per il controllo della performance del terreno di coltura.

Provetta del Controllo Positivo:

1. Eliminare il brodo di coltura dalla provetta **MGIT**.

2. Etichettare la provetta come Controllo Positivo e registrare la data.

3. Preparare una soluzione di solfito di sodio allo 0,4% (0,4 g in 100 mL di acqua distillata o deionizzata sterile). Eliminare la porzione non utilizzata.

4. Versare 5 mL di soluzione di solfito di sodio nella provetta, riavvitare bene il tappo e lasciare la provetta almeno 1 h a temperatura ambiente prima di usarla.

5. Le provette del Controllo Positivo possono essere usate più volte. Ogni provetta del Controllo Positivo, se conservata a temperatura ambiente, può essere usata per un massimo di quattro settimane.

Provetta del Controllo Negativo: Usare come controllo una provetta **MGIT** ancora chiusa e non inoculata.

Lettura dei risultati delle provette:

1. Il Controllo Positivo e il Controllo Negativo sono importanti per l'interpretazione corretta dei risultati.

2. Rimuovere le provette dall'incubatore. Posizionare le provette sulla lampada UV accanto alla provetta del Controllo Positivo e a una provetta non inoculata (Controllo Negativo). Si raccomanda di piazzare sulla lampada UV una serie di provette alla volta (4 per 10 provette). *NOTA: Portare occhiali protettivi UV quando si osserva la fluorescenza. È preferibile la luce normale. Evitare di leggere i risultati in una stanza illuminata dai raggi del sole o oscurata.*

3. Esaminare a occhio le provette **MGIT** che rivelano sensibile fluorescenza. La fluorescenza è identificata dal colore arancione vivo alla base della provetta e dal riflesso arancione nel menisco. La provetta **MGIT** dovrebbe quindi essere tolta dalla rastrelliera e confrontata con le provette del Controllo Positivo e Negativo. Il Controllo Positivo dovrebbe presentare una sensibile fluorescenza (colore arancione molto vivace). Il Controllo Negativo dovrebbe presentare debole o nessuna fluorescenza. Se la fluorescenza prodotta dalla provetta **MGIT** è più simile a quella del Controllo Positivo, il campione è positivo; se è più simile a quella del Controllo Negativo, la provetta è negativa. La crescita può anche essere rilevata dalla presenza nel terreno di una torbidità non omogenea, o di piccoli coaguli.

4. Le provette positive devono essere colorate con reagenti per i bacilli acido-resistenti. Lo striscio delle provette negative deve essere sottoposto a controllo per eventuali contaminazioni batteriche. Si può usare il liquido della provetta **BBL MGIT** per eseguire subcolture allo scopo di identificazione e test di sensibilità a farmaci.

5. Si dovrebbe comunque proseguire nella lettura giornaliera delle provette negative, per otto settimane o più, a seconda del tipo di campione e tenendo conto delle esperienze di laboratorio. Si possono stabilire orari di lettura alternativi. La mancata lettura delle provette per più giorni, come nei fine settimana e nei giorni di festa, può ritardare la diagnosi dei positivi, ma non compromettere la resa del test. Le provette devono essere controllate otticamente per rilevare la presenza di torbidità e di piccoli granuli prima di essere scartate. Le provette **MGIT** negative non possono essere usate di nuovo. Se si sospetta la crescita di Micobatteri, seguire la procedura "Trattamento delle provette **MGIT** positive", indicata a seguito.

Ripetizione del trattamento sulle provette **MGIT contaminate:** Le provette **MGIT** contaminate possono venire decontaminate e concentrate nuovamente utilizzando la stessa procedura iniziale per il trattamento dei campioni.

1. Versare il contenuto della provetta **MGIT** contaminata in una provetta di plastica per centrifuga da 50 mL.

2. Aggiungere 5 mL di soluzione NALC-NaOH nella provetta per centrifuga. Avvitare bene il tappo, poi vortexare la provetta per 5 – 20 s.

3. Lasciare che il campione sedimenti per 15 – 20 min. Non trattare il campione per più di 20 min.

4. Aggiungere 35 mL di tampone fosfato sterile pH 6,8. Rimettere il tappo e miscelare il contenuto.

5. Concentrare il campione centrifugandolo alla velocità di 3.000 x g per 15 min.

6. Con attenzione, fare decantare il fluido supernatante. Risospendere il sedimento, con una pipetta Pasteur sterile, in tampone fosfato pH 6,8.

7. Inoculare 0,5 mL della sospensione in una nuova provetta **MGIT**.

Controllo di qualità per l'utilizzatore: Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Consultare le linee guida CLSI e le norme CLIA in materia, per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità.

Nel sito web di BD sono disponibili dei certificati di controllo qualità. I certificati di controllo qualità riportano i microrganismi di controllo, incluse le culture ATCC specificate nella norma M22-A3 approvata dal CLSI *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.⁹

N.B.: Il Brodo Middlebrook 7H9 (supplementato) è esente dai test di controllo qualità a cura dell'utilizzatore ai sensi della norma CLSI M22-A3.⁹

RISULTATI

Un campione positivo in coltura viene identificato come tale dall'osservazione di fluorescenza, o di torbidità non omogenea o di piccoli coaguli in una provetta **MGIT** inoculata. Le provette positive devono essere subcolturate e si deve allestire un vetrino per l'acido-resistenza. Il risultato positivo di un vetrino per l'acido-resistenza indica la probabile presenza di microrganismi vivi nel campione.

Trattamento delle provette **MGIT positive:**

NOTA: Tutte le procedure devono essere eseguite in una cella di sicurezza biologica.

a) Prelevare la provetta **MGIT** dalla rastrelliera.

b) Usando una pipetta sterile da trasporto, prelevare un'aliquota dal fondo della provetta (circa 0,1 mL) per la preparazione di colorazioni (per l'acido-resistenza e colorazione di Gram).

c) Ispezionare il vetrino e le colorazioni. Dare il referto preliminare solo dopo una valutazione della colorazione per l'acido-resistenza.

Se si riscontra positività alla colorazione per l'acido-resistenza, subcolturare in terreni solidi segnalando come: Positivo alla crescita, Positivo alla colorazione per l'acido-resistenza, In corso di identificazione.

Se sono presenti microrganismi diversi dai bacilli acido-resistenti, segnalare come: Positivo alla crescita, Negativo alla colorazione per l'acido-resistenza, Contaminato.

Se non sono presenti microrganismi, non va dato alcun risultato. Subcolturalo in una piastra di agar sangue e un terreno di coltura per micobatteri; ripetere il vetrino con l'aggiunta di proteina per essere sicuri che l'inoculo è stato fissato al vetrino in modo adeguato.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il grado di recupero dei Micobatteri in una provetta **MGIT** dipende dal numero degli organismi presenti nel campione, dai metodi di prelievo, da fattori dipendenti dal paziente, quali la presenza di sintomi, la terapia somministrata in precedenza, e dal metodo di trattamento del campione. Si raccomanda la decontaminazione col procedimento che usa N-acetil-L-cisteina idrossido di sodio (NALC-NaOH) oppure acido oxalico. Il terreno **BBL MGIT** non è stato testato con nessun altro metodo di decontaminazione. Altre soluzioni di digestione-decontaminazione possono avere effetti dannosi sui Micobatteri.

La morfologia delle colonie e la pigmentazione possono essere determinate solo su terreni solidi. L'acido-resistenza dei Micobatteri può variare a seconda del ceppo, dell'età della coltura e altre variabili. Non è stata stabilita alcuna uniformità della morfologia microscopica nel terreno **BBL MGIT**.

Le provette **MGIT** positive al vetrino per l'acido-resistenza possono essere subcolturate su terreni per Micobatteri sia selettivi che non selettivi, allo scopo di isolamento, con successiva identificazione, e per effettuare prove di sensibilità.

Le provette **MGIT** che si rivelano positive possono contenere altre specie non appartenenti ai Micobatteri. Tali specie non micobatteriche possono crescere di più dei Micobatteri presenti. Tali provette **MGIT** devono essere ridecontaminate e sottoposte a nuova coltura.

Le provette **MGIT** che si rivelano positive possono contenere una o più specie di Micobatteri. I Micobatteri a crescita rapida possono sviluppare una fluorescenza positiva prima di altri Micobatteri a crescita lenta; è importante perciò eseguire una subcoltura delle provette **MGIT** positive, per assicurare l'adeguata identificazione di tutti i Micobatteri presenti nel campione.

Volumi di campione superiori a 0,5 mL aumentano i rischi di contaminazione o in ogni caso influenzano in senso negativo la performance delle provette **MGIT**.

Poiché il brodo **MGIT** è un brodo arricchito e poiché l'indicatore **MGIT** è per natura non selettivo, è importante seguire la procedura di digestione/decontaminazione indicata, al fine di ridurre il rischio di contaminazione. È essenziale seguire le istruzioni procedurali per un recupero ottimale dei Micobatteri.

L'uso della miscela antibiotica **PANTA**, per quanto necessario per tutti i campioni non sterili, può avere effetti inibitori su alcuni Micobatteri. Nel corso delle prove cliniche non sono state eseguite subcolture terminali in modo routinario. Perciò, non è tuttora possibile determinare il tasso reale di falso negatività (definita come la provetta **MGIT** che è rimasta negativa durante tutto il periodo di incubazione di otto settimane, è stata poi subcolturala e ha quindi evidenziato crescita di Micobatteri).

Sono stati compiuti studi su colture per semina con ventitré specie di Micobatteri (ceppi ATCC e selvaggi), usando concentrazioni d'inoculo tra 10³ e 10⁵ UFC/mL. Le specie seguenti sono state rilevate positive nella provetta **MGIT**:

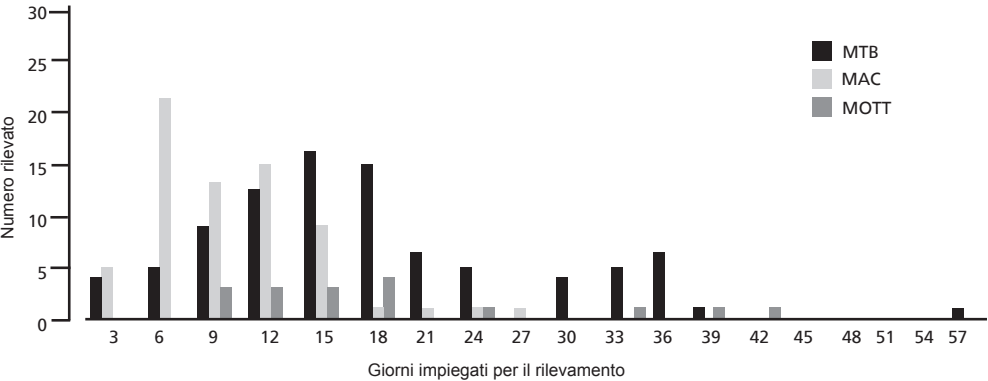
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavescens</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoeense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Specie isolate nel corso della valutazione clinica della provetta **MGIT**.

Gli studi clinici hanno dato prova dell'isolamento di Micobatteri da campioni respiratori, aspirato gastrico, tessuto, feci e liquidi biologici sterili ad eccezione del sangue. Non è stato determinato, per questo prodotto, il recupero di Micobatteri da altri liquidi biologici.

VALORI PREVISTI

Figura 1 – Il diagramma seguente illustra la distribuzione della frequenza dei tempi di recupero nei campioni sottoposti alle prove cliniche, i quali sono risultati positivi col sistema **MGIT**.



CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

La provetta **BBL MGIT**, indicatore di Crescita dei Micobatteri, è stata sottoposta a valutazione in sei sedi cliniche, comprendenti laboratori di igiene pubblica e grossi ospedali di cura intensiva situati in aree geografiche diverse. La popolazione esaminata comprendeva pazienti infetti da HIV, pazienti immunocompromessi e che avevano subito trapianti. Le provette **BBL MGIT** sono state messe a confronto con il sistema radiometrico **BACTEC 460TB**, con il sistema di coltura per Micobatteri **BBL SEPTI-CHEK AFB** e con terreni di crescita convenzionali per il rilevamento e l'isolamento dei Micobatteri da campioni clinici (ad eccezione di sangue e urine). Un totale di 2801 campioni è stato testato durante lo studio. La distribuzione dei campioni testati era: campioni respiratori (78%), gastrici (0,4%), liquidi biologici (9,8%), tessuto (7,0%), feci (2,5%) e altri (2,4%). 318 campioni sono risultati positivi, con un totale di 330 isolati recuperati durante lo studio. Di questi 330 isolati, 253 (77%) provenivano dalle provette **BBL MGIT**, 260 (79%) erano stati rilevati col **BACTEC 460TB** e il **BBL SEPTI-CHEK AFB** e 219 (66%) provenivano da terreni solidi convenzionali. Le provette **BBL MGIT** hanno dimostrato un tasso di falso positività dello 0,5% (**MGIT** fluorescente, nessun bacillo acido-resistente presente). Le provette **BBL MGIT** non sono state in grado di rilevare il 3,7% degli isolati recuperati in uno o più

dei sistemi di riferimento (**BACTEC 460TB**, **BBL SEPTI-CHEK AFB** o terreni solidi convenzionali). Anche se questa percentuale rappresenta una perdita potenziale di recupero, essa non è indicativa di una determinazione reale di falso negatività (vedere la sezione "Limitazioni della Procedura"). L'uso di un secondo terreno di coltura, come raccomandato, aumenta la probabilità di recupero dei Micobatteri. Il tasso medio di contaminazione per le provette **BBL MGIT** è stato del 9,7%.

SEDI BACTEC

Tabella 2 - Rilevamento degli isolati positivi alla presenza di Micobatteri nelle valutazioni cliniche

Isolato	Totale Isolati	Totale MGIT	MGIT Solamente	Totale BACTEC	BACTEC Solamente	Totale CONV.	CONV. Solamente
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
<i>M. kansasii</i>	5	2	0	5	1	4	0
<i>M. fortuitum</i>	9	5	3	3	1	5	3
<i>M. chelonae</i>	2	0	0	2	1	1	0
<i>M. xenopi</i>	2	0	0	2	2	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	11	4	1	4	1	9	5
<i>M. flavescens</i>	2	1	0	2	1	0	0
Tutti MICO	244*	180*	15*	203	27	168	17

***NOTA:** Quattordici isolati **MGIT SOLAMENTE** non sono stati inclusi in questo prospetto, poiché ad una identificazione presunta non è seguita la conferma finale della loro identità.

SEDI SEPTI-CHEK

Tabella 3 - Rilevamento degli isolati positivi alla presenza di Micobatteri nelle valutazioni cliniche

Isolato	Totale Isolati	Totale MGIT	MGIT Solamente	Totale SEPTI-CHEK	SEPTI-CHEK Solamente	Totale CONV.	CONV. Solamente
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
<i>M. kansasii</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	2	2	2	0	0	0	0
Tutti MICO	67*	54*	9*	57	4	51	0

***NOTA:** Cinque isolati **MGIT SOLAMENTE** non sono stati inclusi in questo prospetto, poiché ad una identificazione presunta non è seguita la conferma finale della loro identità.

DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione
245111	Provette BD BBL MGIT indicatori della crescita di Micobatteri, 4 mL, confezione da 25 provette.
245113	Provette BD BBL MGIT indicatori della crescita di Micobatteri, 4 mL, confezione da 100 provette.
245116	OADC BD BBL MGIT , 15 mL, confezione da 6 fiale. Ogni fiala sufficiente per 25 provette MGIT .
220908	Becchi di clarino BD BBL per terreno Lowenstein-Jensen, confezione da 10 (provette da 20 x 148 mm, con tappo).
220909	Becchi di clarino BD BBL per terreno Lowenstein-Jensen, confezione da 100 (provette da 20 x 148 mm, con tappo).
240862	Kit BD BBL MycoPrep per digestione/decontaminazione di campioni, contenente dieci flaconi da 75 mL di soluzione NALC-NaOH e 5 confezioni di tampone fosfato.
240863	Kit BD BBL MycoPrep per digestione/decontaminazione di campioni, contenente dieci flaconi da 150 mL di soluzione NALC-NaOH e 10 confezioni di tampone fosfato
245114	Miscela antibiotica PANTA BD BBL MGIT liofilizzata, confezione da 6 fiale. Ogni fiala sufficiente per 25 provette MGIT .
220959	Becchi di clarino di agar BD BBL 7H10 Middlebrook e Cohn, confezione da 100.
295939	Brodo BD BBL Middlebrook 7H9, 8 mL, confezione da 10 provette.
221818	Soluzione salina normale BD BBL , 5 mL, confezione da 10.
221819	Soluzione salina normale BD BBL , 5 mL, confezione da 100.
231729	BD BBL Taxo Differentiation Discs X, 50 dischi/cartuccia.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com.



BD BBL MGIT

Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA Antibiotic Mixture

(Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias, Enriquecimento OADC,
Mistura Antibiótica PANTA)

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias **BBL MGIT**) suplementado com enriquecimento **BBL MGIT** OADC e a **BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture (Mistura Antibiótica **PANTA BBL MGIT**), quando adequado, destina-se à detecção e isolamento de micobactérias. Os tipos de amostras aceitáveis são amostras clínicas digeridas e descontaminadas (excepto urina) e líquidos corporais estéreis (excepto sangue).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

De 1985 para 1992, o número de casos de MTB notificados aumentou 18%. A tuberculose ainda mata cerca de 3 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, o que a torna a principal causa de morte entre as doenças infecciosas.¹ Entre 1981 e 1987, a vigilância dos casos de SIDA indicou que 5,5% dos doentes com SIDA apresentavam infecções micobacterianas não tuberculosas disseminadas, por exemplo, o MAC. Em 1990, o aumento dos casos de infecções micobacterianas não tuberculosas disseminadas resultou numa incidência cumulativa de 7,6%.² Além do ressurgimento do MTB, o MTB resistente a múltiplos fármacos (MDR-TB) tem constituído uma preocupação crescente. Os atrasos laboratoriais no crescimento, identificação e notificação destes casos de MDR-TB contribuiu, pelo menos em parte, para a disseminação da doença.³

O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) dos E.U. recomendou aos laboratórios que efectuassem todos os esforços no sentido de utilizarem os métodos mais rápidos disponíveis para o teste de diagnóstico de micobactérias. Estas recomendações incluem a utilização de um meio líquido e de um meio sólido para a cultura de micobactérias.³

O **MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contém 4 mL de base de Middlebrook 7H9 Broth (Meio Líquido Middlebrook 7H9) modificado.^{4,5} O meio completo, enriquecido com 0,5 mL de OADC e com 0,1 mL da **PANTA** antibiotic mixture, é um dos meios líquidos mais frequentemente utilizados para a cultura de micobactérias.

Todos os tipos de amostras clínicas, pulmonares e extrapulmonares (excepto sangue e urina) podem ser processadas para o isolamento primário no tubo **MGIT** utilizando os métodos convencionais.⁶ A amostra processada é inoculada dentro de um tubo **MGIT**, incubada e lida diariamente a partir do segundo dia de incubação, utilizando uma luz UV de onda longa. Quando o tubo atinge positividade, existem aproximadamente $10^4 - 10^7$ UFC/mL de micobactérias presentes.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

No fundo dos tubos de 16 x 100 mm com fundo redondo existe um composto fluorescente envolvido em silicone. O composto fluorescente é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. Inicialmente, a grande quantidade de oxigénio dissolvido anula as emissões provenientes do composto sendo detectada apenas uma pequena quantidade de fluorescência. Posteriormente, um microrganismo com respiração activa irá consumir o oxigénio e permitir que se observe fluorescência recorrendo a um transiluminador UV a 365 nm ou a uma fonte UV de onda longa (lâmpada de Wood). O crescimento também pode ser detectado pela presença de uma turvação não homogénea ou por pequenos grãos ou flocos no meio de cultura.

Os componentes do meio são substâncias essenciais para o rápido crescimento de micobactérias. O ácido oleico é utilizado pelos bacilos da tuberculose e desempenha um papel importante no metabolismo das micobactérias. A albumina actua como agente protector, ligando-se aos ácidos gordos livres que podem ser tóxicos para as espécies de *Mycobacterium*, melhorando assim o seu isolamento. A dextrose é uma fonte de energia. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio.

A contaminação pode ser reduzida quando, antes da inoculação com uma amostra clínica, a base **BBL MGIT** e o enriquecimento **BBL MGIT** OADC combinados são suplementados com **BBL MGIT PANTA** Antibiotic Mixture.

REAGENTES

O **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contém: 110 µL de indicador fluorescente e 4 mL de meio líquido. O indicador contém Tris 4, 7-difenil-1,10, pentahidrato de cloreto de ruténio de 10-fenantrolina numa base de borracha de silicone. Os tubos são purgados com CO₂ a 10% e fechados com tampas de polipropileno.

Fórmula* Aproximada por 1 L de Água Purificada

Base de BBL Middlebrook 7H9 Broth modificado	5,9 g
Peptona de caseína	1,25 g

BBL MGIT OADC é enriquecido com 15 mL de Middlebrook OADC.

Fórmula* Aproximada por 1 L de Água Purificada

Albumina bovina	50,0 g	Catalase	0,03 g
Dextrose	20,0 g	Ácido oleico	0,6 g

O **PANTA MGIT BBL** contém uma mistura liofilizada de agentes antimicrobianos.

Fórmula* Aproximada Por Frasco Liofilizado de **PANTA**

Polimixina B	6.000 unidades	Trimetoprim	600 µg
Anfotericina B	600 µg	Azlocilina.....	600 µg
Ácido nalidixico	2.400 µg		

*Ajustado e/ou suplementado conforme necessário para cumprir os critérios de desempenho.

Instruções de Uso: Reconstitua um frasco liofilizado da **BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture com 3 mL de água destilada ou designizada estéril.

Advertências e Precauções: Para uso em Diagnóstico *in-vitro*.

Microrganismos patogénicos, incluindo o vírus de Hepatite B e o Vírus da Imunodeficiência Humana, podem estar presentes nas amostras. Na manipulação de todos os itens contaminados com sangue ou outros líquidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções Universais"^{1,2}.

Para trabalhar com o *Mycobacterium tuberculosis* cultivado em meio de cultura são exigidas práticas, equipamentos de contenção e instalações de Nível 3 de Biosegurança.⁶

Antes de ser utilizado, cada tubo **MGIT** deve ser examinado relativamente a contaminação ou danos. Elimine quaisquer tubos que lhe pareçam inadequados ou exibam fluorescência antes de serem utilizados.

Tubos que caíam deverão ser analisados cuidadosamente. Se forem observados danos, o tubo deverá ser descartado.

Usar óculos protectores contra UV quando se observar a fluorescência e utilizar exclusivamente iluminação com ondas longas (365 nm). NÃO USAR LUZ UV DE ONDA CURTA PARA LER OS TUBOS.

Submeter todos os tubos **MGIT** inoculados ao autoclave antes de proceder ao seu descarte.

Armazenamento dos reagentes: BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes – Após a recepção, armazene-os entre 2 e 25 °C. NÃO CONGELAR. Minimizar a exposição à luz. O caldo de carne deverá ter um aspecto transparente e incolor. Não usar se estiver turvo. Os tubos **MGIT** que forem armazenados conforme é indicado no rótulo, antes de serem utilizados, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante um período de até oito semanas.

BBL MGIT OADC – Após a recepção, armazene entre 2 e 8 °C, ao abrigo da luz. Evite congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz.

BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture – Após a recepção, armazene os frascos liofilizados entre 2 e 8 °C. Logo que seja reconstituída, a mistura **PANTA** pode ser utilizada no prazo de 72 horas, desde que seja armazenada entre 2 e 8 °C, e no prazo de 6 meses, se for armazenada a -20 °C ou menos. Depois de descongelada, a mistura **PANTA** deve ser utilizada imediatamente. Descarte o que não utilizar.

RECOLHA E MANUSEAMENTO DAS AMOSTRAS

A colheita e o transporte de todas as amostras devem ser efectuados de acordo com as recomendações do CDC, do *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Manual de Procedimentos de Microbiologia Clínica) ou do manual de procedimentos do seu laboratório.^{6,8}

DIGESTÃO, DESCONTAMINAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

Para a inoculação dos tubos **MGIT**, as amostras de diferentes locais do corpo deverão ser processadas da seguinte forma:

SALIVA: As amostras devem ser processadas utilizando o método de NALC-NaOH, tal como é recomendado pela publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* (Micobacteriologia de Saúde Pública: Um Guia para o Laboratório de Nível III)⁶. Em alternativa, utilize o conjunto **BBL MycoPrep** para o processamento de amostras de micobactérias (consulte a secção “Disponibilidade”).

ASPIRADO GÁSTRICO: As amostras devem ser descontaminadas de forma idêntica à das amostras de saliva. Se o volume da amostra for superior a 10 mL, concentre-a por centrifugação. Volte a suspender o sedimento em cerca de 5 mL de água estéril e, em seguida, descontamine. Se a amostra for espessa ou mucóide, adicione uma pequena quantidade de pó NALC (50 a -100 mg). Após a descontaminação, concentre novamente a amostra antes de a inocular dentro do tubo **MGIT**.

FLUÍDOS ORGÂNICOS (LCR, líquido sinovial, líquido pleural, etc.): As amostras cuja colheita foi efectuada de forma asséptica e que se prevê não conterem outras bactérias, podem ser inoculadas sem serem descontaminadas. Se o volume da amostra for superior a 10 mL, concentre-a por centrifugação a 3.000 x g durante 15 min. Elimine o líquido sobrenadante. Inocule o tubo **MGIT** com o sedimento. As amostras que se espera poderem conter outras bactérias devem ser descontaminadas.

TECIDOS: As amostras de tecidos devem ser processadas de acordo com as recomendações da publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* (Micobacteriologia de Saúde Pública: um Guia para o Laboratório de Nível III).⁶

FEZES: Suspensa 1 g de fezes em 5 mL de **BBL** Middlebrook 7H9 Broth. Agite a suspensão num misturador vortex durante 5 segundos. Prossiga com o procedimento NALC-NaOH, tal como é recomendado pela publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* (Micobacteriologia de Saúde Pública: um Guia para o Laboratório de Nível III).⁶

PROCEDIMENTO

Material Fornecido: BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 4 mL, embalagem de 25 e 100 tubos ou **BBL MGIT OADC**, 6 frascos, 15 mL ou **BBL MGIT PANTA** Antibiotic Mixture, 6 frascos liofilizados (ver “Apresentação”).

Material Necessário Mas Não Fornecido: Tubos de centrifuga de 50 mL da marca **Falcon**, hidróxido de sódio a 4%, solução de citrato de sódio a 2,9%, N-acetil-L-cisteína em pó, tampão fosfato, pH 6,8, misturador vortex, incubadora a 37 °C, pipetas estéreis de 1 mL, pipetas de distribuição estéreis, transiluminador UV (365 nm) ou lâmpada de Wood com luz de onda longa ou luz negra, solução de sulfito de sódio a 0,4% (procedimento em baixo), **BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (Agar Middlebrook e Cohn 7H10 **BBL**), **BBL MycoPrep**, **BBL** Middlebrook 7H9 Broth (Meio Líquido de Middlebrook 7H9) (consulte a secção “Apresentação”) ou outros agares ou meios à base de ovo para micobactérias, homogenizador de tecidos ou zaragatoa estéril, **BBL** Normal Saline (Solução Salina Normal **BBL**) (consulte a secção “Apresentação”), microscópio e material para a coloração de lâminas, pipetas de 100 µL e 500 µL, pontas de pipeta correspondentes, 5% sheep blood agar plate (agar de sangue de ovelha a 5%), Óculos Eye Guard (UVP #UVC-303, San Gabriel, CA) e desinfetante tuberculocida.

Inoculação dos Tubos MGIT:

1. Identifique o tubo **MGIT** com o número da amostra.
2. Desenrosque a tampa e adicione, de forma asséptica, 0,5 mL de **MGIT OADC**.
3. Adicionar, de forma asséptica, 0,1 mL de **MGIT PANTA** antibiotic mixture reconstituída. Para obter melhores resultados, a adição do OADC enrichment e **PANTA** antibiotic mixture deverá ser efectuada momentos antes da inoculação da amostra.
4. Adicione 0,5 mL da suspensão de amostra concentrada preparada conforme é indicado em cima. Adicione também uma gota (0,1 mL) de amostra a uma placa de agar 7H10 ou a outro agár sólido ou meio à base de ovo para micobactérias. *NOTA: Volumes de amostra superiores a 0,5 mL podem aumentar a contaminação ou afectar adversamente, de outra forma, o desempenho dos tubos.*
5. Volte a colocar a tampa no tubo, aperte e misture bem.
6. Os tubos devem ser incubados a 37 °C.

Para as amostras nas quais se suspeita da existência de micobactérias com diferentes necessidades de incubação, pode ser preparado um tubo **MGIT** em duplicado, o qual será incubado à temperatura apropriada; por exemplo, 30 ou 42 °C. Inocule e incube à temperatura exigida.

Para as amostras nas quais se suspeita da existência de *Mycobacterium haemophilum*, deverá ser introduzida dentro do tubo, no momento da inoculação, uma fonte de hemina; o tubo deverá ser incubado a 30 °C. Antes de inocular a amostra, coloque, de forma asséptica, um dos discos **BBL Taxo** Differentiation Discs X dentro de cada um dos tubos **MGIT** em que é necessária a adição de hemina (consulte a secção “Apresentação”).

7. Leia os tubos diariamente começando no segundo dia de incubação depois do procedimento “Ler os Tubos” em baixo.

Preparação de Tubos de Controlo Positivo e Negativo Interpretativos: A utilização dos tubos de Controlo Positivo e Negativo destina-se apenas à interpretação da fluorescência e não se destina a actuar como controlo para o desempenho dos meios.

Tubo de Controlo Positivo:

1. Esvaziar meio líquido de um tubo **MGIT** não inoculado.
2. Identificar o tubo como um Controlo Positivo e registar a data.

3. Preparar uma solução de sulfito de sódio a 0,4% (0,4 g em 100 mL de água destilada ou desionizada estéril). Descarte o que não utilizar.
4. Adicionar 5 mL de solução de sulfito de sódio ao tubo, voltar a colocar a tampa, apertar e deixar que o tubo assente no mínimo 1 hora à temperatura ambiente antes de utilizar.
5. Os tubos de controlo positivo podem ser utilizados várias vezes. Cada tubo de Controlo Positivo pode ser utilizado durante um período máximo de 4 semanas quando armazenados à temperatura ambiente.

Tubo de Controlo Negativo: Utiliza-se um tubo **MGIT** fechado e não inoculado como controlo.

Ler os Tubos:

1. Um Controlo Positivo e um Controlo Negativo são importantes para uma interpretação correcta dos resultados.
2. Retire os tubos da incubadora. Coloque os tubos na luz UV junto a um tubo de Controlo Positivo e a um tubo não inoculado (controlo Negativo). Recomenda-se que seja colocado um suporte de tubos de cada vez (4 por 10 tubos) na luz UV. *NOTA: Use óculos com protecção UV quando observar a fluorescência. É preferível luz ambiente normal. Evite ler os tubos numa sala iluminada pelo sol ou numa sala escurificada.*
3. Localize visualmente os tubos **MGIT** que apresentam uma fluorescência intensa. A fluorescência é detectada como cor de laranja muito intenso na base do tubo e também como um reflexo laranja no menisco. O tubo **MGIT** deve ser então retirado do suporte e comparado com os tubos do Controlo Positivo e do Controlo Negativo. O Controlo Positivo deve apresentar um grau elevado de fluorescência (cor de laranja muito intenso). O Controlo Negativo deve apresentar muito pouca ou nenhuma fluorescência. Se a fluorescência do tubo **MGIT** se parecer mais com o Controlo Positivo, trata-se de um tubo positivo. Se se parecer mais com o Controlo Negativo, trata-se de um tubo negativo. O crescimento também pode ser detectado pela presença de uma turvação não homogénea ou por pequenos grãos ou flocos no meio de cultura.
4. Os tubos positivos devem ser objecto de coloração para bacilos ácido-rápidos. Os tubos com esfregaço negativo devem ser verificados relativamente à presença de contaminação bacteriana. As subcultura para os testes de identificação e de sensibilidade a fármacos podem ser efectuadas utilizando líquido proveniente do tubo **BBL MGIT**.
5. Os tubos negativos devem continuar a ser lidos diariamente durante oito semanas ou mais, dependendo do tipo de amostra e da experiência prévia do laboratório. Podem estabelecer-se programas de leitura alternativos. A não leitura dos tubos durante vários dias, como sucede durante fins de semana ou feriados, pode atrasar a detecção de tubos positivos, mas não irá afectar adversamente, de outra forma, o desempenho do meio. Os tubos devem ser verificados visualmente relativamente à presença de turvação e pequenos grãos ou grânulos antes de serem eliminados. Os tubos **MGIT** negativos não podem ser reutilizados. Caso se suspeite de crescimento de micobactérias, siga o procedimento "Processamento de um Tubo **MGIT** Positivo" conforme descrito em baixo.

Reprocessamento dos tubos MGIT Contaminados: Os tubos **MGIT** contaminados podem voltar a ser descontaminados e concentrados utilizando o mesmo procedimento utilizado para processar inicialmente a amostra.

1. Adicione o conteúdo do tubo **MGIT** contaminado a um tubo de centrifuga de plástico de 50 mL.
2. Adicione 5 mL de solução de NALC-NaOH ao tubo de centrifuga. Com a tampa apertada, coloque o tubo no misturador de vórtice durante 5 a 20 segundos.
3. Deixe o tubo assentar durante 15 a 20 min. Não trate durante mais de 20 min.
4. Adicione 35 mL do tampão fosfato estéril pH 6,8. Volte a colocar a tampa e homogeneize o conteúdo.
5. Concentre a amostra numa centrifuga a uma velocidade de 3.000 x g durante 15 min.
6. Decante cuidadosamente o líquido sobrenadante da esfera. Volte a suspender a esfera utilizando uma pipeta de Pasteur estéril com tampão fosfato pH 6,8.
7. Inocule 0,5 mL da suspensão num novo tubo **MGIT**.

Controlo de Qualidade do Utilizador: Os requisitos de controlo da qualidade têm de ser realizados de acordo com os regulamentos ou as exigências de acreditação aplicáveis locais, estatais e/ou federais [EUA] e os procedimentos de Controlo da Qualidade em vigor no laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as orientações do CLSI e os regulamentos da CLIA pertinentes sobre as práticas de controlo de qualidade apropriadas.

O site da BD na internet fornece Certificados do Controlo de Qualidade. Os Certificados do Controlo de Qualidade contêm uma lista dos organismos para teste, incluindo as culturas ATCC especificadas na norma M22-A3 aprovada CLSI, *Controlo de Qualidade para os Meios de Cultura Preparados Comercialmente*.⁹

NOTA: O caldo Middlebrook 7H9 (suplementado) está isento de testes de controlo de qualidade do utilizador, em conformidade com a norma CLSI M22-A3.9

RESULTADOS

Uma amostra positiva em cultura é identificada pela observação de fluorescência ou turvação não homogénea, pequenos grãos ou flocos num tubo **MGIT** inoculado. Deverá ser efectuada uma subcultura, seguida de um esfregaço com coloração ácida rápida, a partir dos tubos positivos. Um resultado positivo de esfregaço ácido-rápido indica a presença presuntiva de microorganismos viáveis no tubo.

Processamento de um Tubo MGIT Positivo:

NOTA: Todos os passos devem ser executados numa câmara de segurança biológica.

- a) Retire o tubo **MGIT** do suporte de teste.
- b) Utilizando uma pipeta de distribuição estéril, retire uma alíquota do fundo do tubo (aproximadamente 0,1 mL) para a realização das preparações coradas (colorações AFB e Gram).
- c) Inspeccione o esfregaço e as preparações. Efectue o relatório dos resultados preliminares apenas após a avaliação da coloração ácida rápida.

Se for AFB positivo, efectue uma repicagem para um meio sólido e descreva como: Positivo para o crescimento, esfregaço AFB positivo, ID pendente.

Se existirem outros microorganismos além de AFB, descreva como: Positivo para o crescimento, esfregaço AFB negativo, Contaminado.

Se não existirem microorganismos, não existe resultado a relatar. Efectue uma subcultura do meio líquido em agar de sangue e meio de cultura de micobactérias; repita o esfregaço utilizando a adição de proteínas para garantir que o inóculo fica adequadamente fixo na lâmina.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O isolamento de micobactérias no tubo **MGIT** depende do número de organismos presentes na amostra, dos métodos de colheita da amostra, de factores relacionados com o doente, tais como a presença de sintomas, tratamentos anteriores e método de processamento.

É recomendada a descontaminação com o método da N-acetil-L-cisteína Hidróxido de sódio (NALC-NaOH) ou ácido oxálico. Não foram testados outros métodos de descontaminação em conjunto com o meio **MGIT BBL**. As soluções utilizadas para a digestão/descontaminação podem ter efeitos prejudiciais sobre as micobactérias.

A morfologia e a pigmentação das colónias apenas podem ser determinadas em meios sólidos. As micobactérias podem variar na rapidez com que adquirem a coloração ácida, dependendo da estirpe, da idade da cultura e de outras variáveis. A consistência da morfologia microscópica no meio **MGIT BBL** ainda não foi estabelecida.

Poderá ser efectuada uma repicagem de um tubo **MGIT** com esfregaço AFB positivo em meios selectivos e não selectivos para micobactérias, para o isolamento e identificação e para testes de sensibilidade.

Os tubos **MGIT** que são positivos podem conter outras espécies além de micobactérias. O crescimento de outras espécies pode sobrepor-se ao das micobactérias presentes. Estes frascos **MGIT** devem ser novamente descontaminados e cultivados.

Os tubos **MGIT** que são positivos no instrumento podem conter uma ou mais espécies de micobactérias. As micobactérias com crescimento mais rápido podem desenvolver fluorescência positiva antes das micobactérias com crescimento lento; portanto, é importante efectuar uma subcultura dos tubos **MGIT** positivos para garantir uma identificação correcta de todas as micobactérias presentes na amostra.

Volumes de amostra superiores a 0,5 mL podem aumentar a contaminação ou afectar adversamente, de outra forma, o desempenho dos tubos **MGIT**.

Devido à riqueza do meio líquido **MGIT** e à natureza não selectiva do indicador **MGIT**, deverá cumprir o procedimento de digestão/descontaminação descrito para diminuir a possibilidade de contaminação. O cumprimento das instruções do procedimento é primordial para a optimização do isolamento de micobactérias.

A utilização da mistura de antibióticos **PANTA**, apesar de ser necessária para todas as amostras não estéreis, pode exercer efeitos inibidores sobre algumas micobactérias.

Durante os estudos clínicos, não foram efectuadas subculturas terminais como rotina. Portanto, nesta fase não é possível determinar uma taxa real de falsos negativos (definidos como um tubo **MGIT** que permaneceu negativos ao longo do período de incubação de oito semanas, foi objecto de subcultura e onde ocorreu o crescimento de uma micobactéria).

Os estudos das culturas semeadas foram efectuados com vinte e três espécies (ATCC e estirpes selvagens) de micobactérias utilizando níveis de inóculo que variaram entre 10³ e 10⁵ UFC/mL. As espécies seguintes foram detectadas como positivas no tubo **MGIT**:

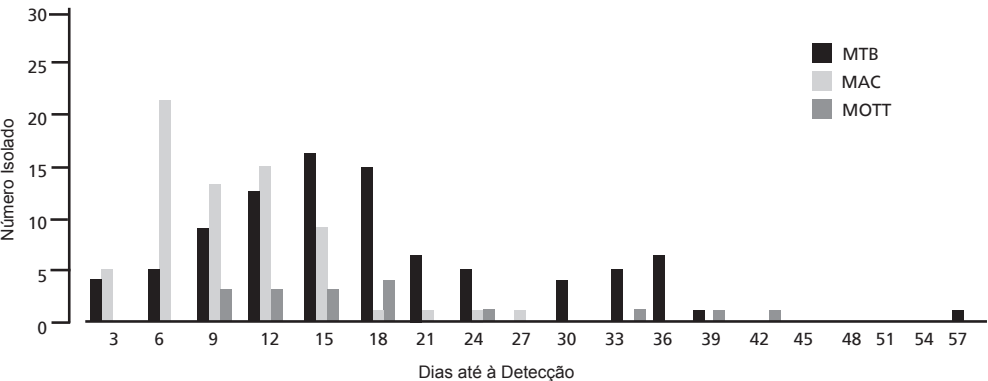
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavesces</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Espécies isoladas durante a avaliação clínica do tubo **MGIT**.

Os estudos clínicos efectuados demonstraram o isolamento de micobactérias a partir de amostras do aparelho respiratório, tecidos, fezes e líquidos corporais estéreis excepto sangue; o isolamento de micobactérias a partir de outros líquidos corporais ainda não foi estabelecido para este produto.

VALORES ESPERADOS

1- A distribuição da frequência dos tempos de isolamento para as amostras de ensaio clínico positivas no Sistema **BBL MGIT** encontra-se ilustrada na figura seguinte.



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube foi avaliado em seis locais clínicos, incluindo laboratórios de saúde pública, assim como hospitais de grandes dimensões com serviço de urgência, em diversas áreas geográficas. A população local incluiu doentes infectados com o VIH, doentes imunodeprimidos e doentes transplantados. Os tubos **BBL MGIT** foram comparados com o sistema radiométrico 460TB **BACTEC**, com o Sistema de Cultura de Micobactérias AFB **Septi-Chek BBL** e com meios de crescimento sólidos convencionais para a detecção e isolamento de micobactérias em amostras clínicas (excepto sangue e urina). Durante o estudo, foram testadas um total de 2801 amostras. A distribuição das amostras testadas de acordo com a origem foi: aparelho respiratório (78%), gástrico (0,4%), líquidos corporais (9,8%), tecidos (7,0%), fezes (2,5%) e outros (2,4%). Durante o estudo, um total de 318 amostras foram positivas, o que representou a detecção de 330 isolados. Destes 330 isolados, 253 (77%) foram isolados pelos tubos **BBL MGIT**, 260 (79%) foram isolados pelo Sistema **BACTEC** 460TB e **BBL Septi-Chek** AFB e 219 (66%) foram isolados pelos meios sólidos convencionais. Os tubos **BBL MGIT** demonstraram uma taxa de falsos positivos de 0,5% (fluorescente no **MGIT**, nenhum AFB presente). Os tubos **BBL MGIT** não detectaram 3,7% dos isolados que haviam sido isolados em um ou mais sistemas de referência (**BACTEC** 460TB, **BBL Septi-Chek** AFB ou meios sólidos convencionais). Apesar de esta percentagem representar uma potencial perda de isolamentos, ela não é indicativa da taxa real de falsos negativos (consulte a Secção "Limitações do Procedimento"). A utilização de um segundo meio, conforme recomendado, aumentará a probabilidade de isolamento de micobactérias. A taxa média de contaminação por sobreposição de crescimento para os tubos **BBL MGIT** foi de 9,7%.

LOCAIS BACTEC

Quadro 2 - Detecção de Isolados Positivos de Microbactérias nas Avaliações Clínicas

Isolado	Total de Isolados	MGIT Total	Apenas MGIT	BACTEC Total	Apenas BACTEC	Total CONV	Apenas CONV
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
<i>M. kansasii</i>	5	2	0	5	1	4	0
<i>M. fortuitum</i>	9	5	3	3	1	5	3
<i>M. chelonae</i>	2	0	0	2	1	1	0
<i>M. xenopi</i>	2	0	0	2	2	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	11	4	1	4	1	9	5
<i>M. flavescens</i>	2	1	0	2	1	0	0
Todas MICO	244*	180*	15*	203	27	168	17

*NOTA: Quatorze isoados APENAS MGIT não estão incluídos nestes dados. Foi efectuada identificação presumptivasem confirmação final da ID.

LOCAIS SEPTI-CHEK

Quadro 3 - Detecção de Isolados Positivos de Microbactérias nas Avaliações Clínicas

Isolado	Total de Isolados	MGIT Total	Apenas MGIT	SEPTI-CHEK Total	Apenas SEPTI-CHEK	Total CONV	Apenas CONV
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
<i>M. kansasii</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	2	2	2	0	0	0	0
Todas MICO	67*	54*	9*	57	4	51	0

*NOTA: Cinco isoados APENAS MGIT não estão incluídos nestes dados. Foi efectuada identificação presumptivasem confirmação final da ID.

APRESENTAÇÃO

Cat. No.	Descrição
245111	BD BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 4 mL, caixa de 25 tubos.
245113	BD BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 4 mL, caixa de 100 tubos.
245116	BD BBL MGIT OADC, 15 mL, caixa de 6 frascos. Cada frasco é suficiente para 25 tubos MGIT .
220908	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, embalagem de 10 (tubos de 20 x 148 mm com tampa).
220909	BD BBL Lowenstein-Jensen Medium Slants, caixa de 100 (tubos de 20 x 148 mm com tampa).
240862	BD BBL MycoPrep Specimen Digestion/Decontamination Kit, dez frascos de 75 mL de Solução NALC-NaOH e 5 embalagens de tampão de fosfato.
240863	BD BBL MycoPrep Specimen Digestion/Decontamination Kit, dez frascos de 150 mL de Solução NALC-NaOH e 10 embalagens de tampão de fosfato.
245114	BD BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture, liofilizada, caixa de 6 frascos. Cada frasco é suficiente para 25 tubos MGIT .
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, caixa de 100.
295939	BD BBL Middlebrook 7H9 Broth, 8 mL, embalagem de 10 tubos.
221818	BD BBL Normal Saline, 5 mL, embalagem de 10.
221819	BD BBL Normal Saline, 5 mL, caixa de 100.
231729	BD BBL Taxo Differentiation Discs X, 50 discos por cartucho.

BIBLIOGRAFIA : Consulte "References" no texto em Inglês.

Assistência Técnica e Suporte: contacte o representante local da BD ou visite www.bd.com.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.
Importado e Distribuído no Brasil por:
Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda
Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil
CNPJ 21.551.379/0013-31
Serviço de Suporte Técnico (11)5185-9961
Registro ANVISA nº 10033430437 (Tubo Indicador do Crescimento de Micobactérias **BBL MGIT**)
Registro ANVISA nº 10033430429 (Mistura Antibiótica **PANTA BBL MGIT**)
Registro ANVISA nº 10033430428 (Enriquecimento **BBL MGIT** OADC)
Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555654

BD BBL MGIT

Mycobacteria Growth Indicator Tube, OADC Enrichment, PANTA Antibiotic Mixture

(Tubo indicador de crecimiento micobacteriano, enriquecimiento OADC,
mezcla antibiótica PANTA)

Español

USO PREVISTO

El tubo **BBL MGIT** indicador de crecimiento micobacteriano suplementado con el caldo de enriquecimiento **BBL MGIT** OADC y cuando es apropiado, la mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA**, está destinado para la detección y recuperación de micobacterias. Los tipos de muestra aceptables son muestras clínicas digeridas y descontaminadas (excepto orina) y fluidos corporales estériles (excepto sangre).

RESUMEN Y EXPLICACION

Entre 1985 y 1992, el número de casos de MTB comunicados aumentó un 18%. La tuberculosis todavía produce una mortalidad anual de 3 millones de personas en todo el mundo, la cual la convierte en la principal causa infecciosa de muerte.¹ Entre 1981 y 1987, la vigilancia de los casos de SIDA encontró un 5,5% de pacientes con SIDA con infecciones micobacterianas no tuberculosas diseminadas, es decir, MAC. En 1990, el aumento en el número de casos de infección micobacteriana no tuberculosa diseminada había producido una incidencia acumulativa del 7,6%.² Por encima del resurgimiento de MTB, el MTB con polifármaco resistencia (MDR-TB) genera cada vez más preocupación. La lentitud de los laboratorios en el crecimiento, identificación y comunicación de estos casos de MDR-TB ha contribuido, al menos en parte, a la diseminación de la enfermedad.³

Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de los EE.UU. han recomendado que los laboratorios se esfuercen todo lo posible en utilizar los métodos más rápidos disponibles para el análisis diagnóstico de micobacterias. Estas recomendaciones incluyen la utilización de medios de cultivo tanto líquidos como sólidos para el cultivo de micobacterias.³

El tubo **MGIT** indicador de crecimiento micobacteriano contiene 4 mL de base de caldo Middlebrook 7H9 modificado.^{4,5} El medio de cultivo completo, con 0,5 mL de caldo de enriquecimiento OADC y 0,1 mL de mezcla antibiótica **PANTA**, es uno de los medios líquidos usados más frecuentemente para el cultivo de micobacterias.

Todo tipo de muestras clínicas, tanto pulmonares como extrapulmonares (salvo sangre y orina), pueden ser procesadas para el aislamiento primario en tubos **MGIT** utilizando métodos convencionales.⁶ La muestra procesada se inocula en un tubo **MGIT** y se incuba y examina diariamente a partir del segundo día de incubación utilizando luz ultravioleta de onda larga. En el momento de detectarse positividad en el tubo, están presentes aproximadamente $10^4 - 10^7$ UFC/mL de micobacterias.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Un compuesto fluorescente está incluido en silicona en la parte inferior de los tubos de 16 x 100 mm de fondo redondo. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos que respiran activamente consumen el oxígeno y permiten que se observe la fluorescencia mediante el uso de un transiluminador ultravioleta de 365 nm o luz ultravioleta de onda larga (lámpara de Wood). El crecimiento también puede ser detectado por la presencia de turbidez no homogénea o pequeños gránulos o copos en el medio de cultivo.

Los componentes del medio son sustancias esenciales para el crecimiento rápido de micobacterias. El ácido oleico es usado por bacilos tuberculosos y desempeña un papel importante en el metabolismo micobacteriano. La albúmina actúa como agente protector al ligar ácidos grasos libres, los cuales pueden ser tóxicos para las especies *Mycobacterium* y, por lo tanto, ayuda en su recuperación. La dextrosa es una fuente de energía. La catalasa destruye las peroxidasa tóxicas que pueden estar presentes en el medio.

La contaminación puede ser reducida al suplementar el medio de base **BBL MGIT** combinado con el caldo de enriquecimiento **BBL MGIT** OADC con la mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** antes de la inoculación con la muestra clínica.

REACTIVOS

Los tubos **BBL MGIT** indicadores de crecimiento micobacteriano contienen: 110 µL de indicador fluorescente y 4 mL de caldo. El indicador contiene cloruro pentahidratado de Tris-4,7-difenil-1,10 fenantrolina rutenio en una base de silicona. Los tubos se limpian con un chorro de CO₂ al 10% y se cierran con tapones de polipropileno.

Fórmula aproximada* por L de agua purificada

Base de caldo Middlebrook 7H9 modificado.....	5,9 g
Peptona de caseína.....	1,25 g

BBL MGIT OADC contiene 15 mL de caldo de enriquecimiento Middlebrook OADC.

Fórmula aproximada* por L de agua purificada

Albúmina bovina.....	50,0 g	Catalasa.....	0,03 g
Dextrosa.....	20,0 g	Acido oleico.....	0,6 g

El frasco **BBL MGIT PANTA** contiene una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos.

Fórmula aproximada* por frasco liofilizado de **PANTA**

Polimixina B.....	6.000 unidades	Trimetoprim.....	600 µg
Anfotericina B.....	600 µg	Azlocilina.....	600 µg
Acido nalidixico.....	2.400 µg		

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

Instrucciones de uso: Reconstituya un frasco liofilizado de **MGIT PANTA** con 3 mL de agua destilada estéril o desionizada.

Advertencias y precauciones: Para diagnóstico *in vitro*.

Puede haber microorganismos patógenos en las muestras, incluyendo los virus de la hepatitis B y de la inmunodeficiencia humana. Deben seguirse las precauciones universales^{1,2} y las normas del establecimiento en el manejo de cualquier material contaminado con sangre u otros líquidos corporales.

El trabajo con *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo precisa la utilización de prácticas del Nivel de bioseguridad 3 y equipo e instalaciones para contención.⁵

Antes de utilizarlos, inspeccione todos los tubos **MGIT** en busca de evidencias de contaminación o desperfectos. Deseche todos los tubos que no reúnan las condiciones adecuadas o que exhiban fluorescencia antes de utilizarlos.

Si algún tubo se cae, debe ser examinado cuidadosamente. Si nota cualquier daño, deseche el.

Utilice gafas de protección para luz ultravioleta cuando observe la fluorescencia y use solamente iluminación de onda larga (365 nm). NO UTILICE LUZ ULTRAVIOLETA DE ONDA CORTA PARA LAS OBSERVACIONES.

Todos los tubos **MGIT** inoculados deben ser esterilizados en autoclave antes de desecharse.

Almacenamiento de reactivos: Tubos **BBL MGIT** indicadores de crecimiento micobacteriano – En cuanto los reciba, almacénelos entre 2 – 25 °C. NO LOS CONGELE. Reduzca al mínimo la exposición a la luz. El caldo debe estar transparente e incoloro. No lo use si está turbio. Los tubos **MGIT** que han sido almacenados antes del uso como lo indiquen sus etiquetas pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados hasta ocho semanas.

BBL MGIT OADC – En cuanto lo reciba, guárdelo en un sitio oscuro entre 2–8 °C. Evite la congelación o el sobrecalentamiento. No lo abra antes de usarlo. Reduzca al mínimo la exposición a la luz.

Mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** – Almacene los frascos liofilizados entre 2–8 °C. Una vez que se reconstituya, la mezcla **PANTA** puede ser utilizada hasta 72 h, siempre que se almacene entre 2–8 °C, o hasta 6 meses si se almacena a -20 °C o menos. Una vez que se descongele, la mezcla **PANTA** debe ser utilizada inmediatamente. Deseche la parte no utilizada.

RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras deben ser recogidas y transportadas siguiendo las recomendaciones de los CDC, del *Clinical Microbiology Procedures Handbook* o del manual de procedimientos del laboratorio.^{6,8}

DIGESTION, DESCONTAMINACION Y CONCENTRACION

Las muestras procedentes de distintos sitios del cuerpo deben ser procesadas para la inoculación en los tubos **MGIT** en la forma siguiente:

ESPUTO: Las muestras deben ser procesadas utilizando el método NALC-NaOH de acuerdo con las recomendaciones en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* de los CDC.⁶ Alternativamente, use el equipo **BBL MycoPrep** para el procesamiento de muestras micobacterianas (vea “Disponibilidad”).

ASPIRADOS GASTRICOS: Las muestras deben ser descontaminadas como con el esputo. Si el volumen de la muestra es más de 10 mL, concéntrela por centrifugación. Suspenda de nuevo el sedimento en aproximadamente 5 mL de agua estéril y después descontamine. Añada una pequeña cantidad de NALC en polvo (entre 50 – 100 mg) si la muestra es espesa o mucóidea. Después de la descontaminación, concéntrela de nuevo antes de la inoculación en el tubo **MGIT**.

FLUIDOS CORPORALES (LCR, líquido sinovial, líquido pleural, etc.): Las muestras que son recogidas asépticamente y que no se espera que tengan otras bacterias pueden ser inoculadas sin descontaminar. Si el volumen de la muestra es más de 10 mL, concéntrela por centrifugación a 3.000 x g durante 15 min. Elimine el líquido sobrenadante. Inocule el tubo **MGIT** con el sedimento. Las muestras que se espera que tengan otras bacterias deben ser descontaminadas.

TEJIDO: Las muestras de tejido deben ser procesadas de acuerdo con las recomendaciones en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* de los CDC.⁶

MATERIA FECAL: Suspenda 1 g de heces en 5 mL de caldo Middlebrook. Agite la suspensión en un agitador vórtex durante 5 seg. Continúe con el procedimiento de NALC-NaOH siguiendo las recomendaciones en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* de los CDC.⁶

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Tubos **BBL MGIT** indicadores de crecimiento micobacteriano, 4 mL, paquete de 25 y 100 tubos, o **BBL MGIT OADC**, 6 frascos, 15 mL, o mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA**, 6 frascos liofilizados (vea “Disponibilidad”).

Materiales necesarios pero no suministrados: Tubos de centrifugación de 50 mL marca **Falcon**, hidróxido de sodio al 4%, solución de citrato de sodio al 2,9%, N-acetil-L-cisteína en polvo, solución tampón de fosfato pH 6,8, agitador vórtex, incubadora para 37 °C, pipetas estériles de 1 mL, pipetas estériles de transferencia, transiluminador ultravioleta (365 nm) o lámpara de Wood con bombilla de onda larga o luz negra, solución de sulfito de sodio al 0,4% (procedimiento más adelante), agar **BBL** Middlebrook y Cohn 7H10, **BBL MycoPrep**, Caldo **BBL** Middlebrook 7H9 (vea “Disponibilidad”) u otro medio de cultivo de micobacterias a base de agar o de huevo. Homogenizador de tejidos o torunda estéril, solución salina normal **BBL** (vea “Disponibilidad”), microscopio y materiales para teñir preparaciones en portaobjetos, pipetas de 100 µL y 500 µL, puntas de pipeta correspondientes, placa de agar con 5% de sangre de cordero, gafas de protección ocular (UVP N° UVC-303, San Gabriel, CA, USA) y desinfectante tuberculocida.

Inoculación de los tubos **MGIT**:

1. Rotule el tubo **MGIT** con el número de la muestra.
2. Desenrosque el tapón y añada asépticamente 0,5 mL de **MGIT OADC**.
3. Añada asépticamente 0,1 mL de la mezcla antibiótica **MGIT PANTA** reconstituida. Para obtener los mejores resultados, la adición del caldo de enriquecimiento OADC y la mezcla antibiótica **PANTA** debe hacerse justo antes de la inoculación de la muestra.
4. Añada 0,5 mL de la suspensión de muestra concentrada preparada anteriormente. También añada una gota (0,1 mL) de la muestra a una placa de agar 7H10 ó a otro medio micobacteriano de agar sólido o a base de huevo. *NOTA: Un volumen de muestra que sea mayor de 0,5 mL puede aumentar la contaminación o de otro modo afectar en forma adversa el rendimiento de los tubos.*
5. Vuelva a tapar el tubo firmemente y mezcle bien.
6. Incube los tubos a 37 °C.

Para aquellas muestras en que se sospeche la presencia de micobacterias que tienen necesidades de incubación diferentes, se puede preparar e incubar un segundo tubo **MGIT** a la temperatura apropiada; es decir, a 30 °C ó 42 °C. Inocule e incube a la temperatura necesaria.

Para aquellas muestras en que se sospeche la presencia de *Mycobacterium haemophilum*, hay que introducir una substancia que contiene hemina en el momento de la inoculación e incubar el tubo a 30 °C. Coloque asépticamente un disco de **BBL Taxo** Differentiation Discs X en cada tubo **MGIT** que requiere la adición de hemina antes de inocular la muestra (vea “Disponibilidad”).
7. Lea los tubos diariamente comenzando en el segundo día de la incubación, siguiendo el procedimiento “Lectura de los tubos” descrito más adelante.

Preparación de tubos de control positivo y negativo para la interpretación: Se utilizan los tubos de control negativo y de control positivo sólo para la interpretación de la fluorescencia y no para controlar el rendimiento de los medios.

Tubo de control positivo:

1. Vacíe el caldo de un tubo **MGIT** sin inocular.
2. Marque el tubo como control positivo y anote la fecha.
3. Prepare una solución de sulfito de sodio al 0,4% (0,4 g en 100 mL de agua esterilizada o desionizada). Deseche la porción sin usar.
4. Añada 5 mL de la solución de sulfito de sodio al tubo, coloque de nuevo el tapón, ajústelo y deje reposar el tubo durante al menos 1 h a temperatura ambiente antes de usarlo.

5. Los tubos de control positivo pueden ser usados muchas veces. Cada tubo de control positivo puede usarse hasta cuatro semanas cuando se almacena a temperatura ambiente.

Tubo de control negativo: Se utiliza como control un tubo **MGIT** sellado, sin inocular.

Lectura de los tubos:

1. Es importante utilizar un control positivo y un control negativo para la interpretación correcta de los resultados.
2. Saque los tubos de la incubadora. Coloque los tubos bajo la luz ultravioleta al lado de un tubo de control positivo y de un tubo sin inocular (control negativo). Se recomienda que se ponga a la vez una gradilla de tubos (4 x 10 tubos) bajo la luz ultravioleta. *NOTA: Se recomienda llevar gafas de protección para luz ultravioleta cuando observe la fluorescencia. Se prefiere la iluminación habitual. Evite la lectura de los tubos en una pieza con luz solar directa o en una pieza oscurecida.*
3. Localice visualmente los tubos **MGIT** que muestren fluorescencia intensa. La fluorescencia es detectada como un color anaranjado brillante en el fondo del tubo y también como un reflejo anaranjado en el menisco. El tubo **MGIT** debe entonces ser sacado de la gradilla y comparado con los tubos de control positivo y control negativo. El control positivo debe mostrar una alta intensidad de fluorescencia (color anaranjado muy brillante). El control negativo debe tener muy poca o nada de fluorescencia. Si la fluorescencia en el tubo **MGIT** es más parecida al control positivo, es un tubo positivo. Si es más parecida al control negativo, es un tubo negativo. El crecimiento también puede ser detectado por la presencia de una turbidez no homogénea, pequeños gránulos o copos en el medio de cultivo.
4. A los tubos positivos se les debe hacer una tinción para bacilos ácido resistentes. Los tubos de frotis negativos deben ser examinados para determinar si hay contaminación bacteriana. Se pueden hacer subcultivos para la identificación y estudios de susceptibilidad farmacológica utilizando fluido del tubo **BBL MGIT**.
5. Se debe continuar leyendo los tubos negativos diariamente durante ocho semanas o más, dependiendo del tipo de la muestra y de las experiencias previas en el laboratorio. Se pueden establecer regímenes alternativos de lectura de los tubos. El no leer los tubos por varios días como, por ejemplo, durante los fines de semana o días de fiesta, puede retardar la detección de tubos positivos, pero por otra parte no afectará en forma adversa los resultados de los medios. Los tubos deben ser examinados visualmente para verificar la presencia de turbidez y pequeños granos o gránulos antes de ser desechados. Los tubos **MGIT** negativos no pueden ser reutilizados. Si se sospecha el crecimiento micobacteriano, siga el procedimiento "Procesamiento de un tubo **MGIT** positivo" descrito más adelante.

Reprocesamiento de tubos MGIT contaminados: Los tubos **MGIT** contaminados pueden ser descontaminados y concentrados de nuevo utilizando el mismo procedimiento utilizado para el procesamiento inicial de la muestra.

1. Añada el contenido del tubo **MGIT** contaminado a un tubo de plástico de 50 mL para centrifugadora.
2. Añada 5 mL de solución de NALC-NaOH al tubo de centrifugadora. Coloque el tapón y agite el tubo en un vórtex durante 5 – 20 seg.
3. Deje reposar el tubo durante 15 – 20 min. No se debe tratar durante al menos 20 min.
4. Añada 35 mL de tampón de fosfato estéril a pH 6,8. Vuelva a colocar el tapón y mezcle el contenido.
5. Concentre la muestra en una centrifugadora a la velocidad de 3.000 x g durante 15 min.
6. Decante cuidadosamente el fluido sobrenadante del sedimento. Suspenda de nuevo el sedimento usando una pipeta Pasteur estéril con la solución tampón de fosfato a pH 6,8.
7. Inocule 0,5 mL de la suspensión en un tubo **MGIT** nuevo.

Control de calidad por parte del usuario: El control de calidad se debe llevar a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

El sitio web de BD suministra certificados de control de calidad. En los certificados de control de calidad aparecen los organismos de prueba, incluidos los cultivos ATCC especificados en el estándar aprobado del CLSI M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.⁹

NOTA: Según el CLSI M22-A3, no es necesario que el usuario realice un control de la calidad del caldo Middlebrook 7H9 (suplementado).⁹

RESULTADOS

Una muestra de cultivo positivo se identifica por la observación de fluorescencia o turbidez no homogénea, o de pequeños granos o flóculos en un tubo **MGIT** inoculado. Se deben hacer subcultivos y frotis ácido resistentes a partir de los tubos positivos. El resultado positivo del frotis ácido resistente indica la presencia presuntiva de microorganismos viables en el tubo.

Procesamiento de un tubo MGIT positivo:

NOTA: Todos los pasos deben ser efectuados en un gabinete de seguridad biológica.

- a) Saque el tubo **MGIT** de la gradilla.
- b) Utilizando una pipeta de transferencia estéril, saque una alícuota del fondo del tubo (aprox. 0,1 mL) para hacer preparaciones teñidas (tinciones ácido resistentes y de Gram).
- c) Inspeccione el frotis y las preparaciones. Sólo debe comunicarse un resultado positivo después de hacer la tinción para bacilos ácido resistentes.

Si la tinción es positiva para bacilos ácido resistentes, haga un subcultivo en medio sólido y comunique: crecimiento positivo, tinción de bacilos ácido resistentes positiva, identificación pendiente.

Si están presentes otros microorganismos además de bacilos ácido resistentes, comunique: crecimiento positivo, tinción de bacilos ácido resistentes negativa, contaminada.

Si no están presentes otros microorganismos, no hay resultados comunicables. Haga un subcultivo del caldo en una placa de agar sangre y en medio de cultivo de micobacterias; repita el frotis después de añadir proteína para asegurar la fijación del inóculo en el portaobjetos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La recuperación de micobacterias por el tubo **MGIT** depende del número de organismos presentes en la muestra, los métodos de recogida de la muestra, factores del paciente tales como la presencia de síntomas y el tratamiento previo, y el método de procesamiento.

Se recomienda la descontaminación utilizando el método de N-acetil-L-cisteína de hidróxido de sodio (NALC-NaOH) o el método de ácido oxálico. Otros métodos de descontaminación no han sido estudiados conjuntamente con el medio **BBL MGIT**. Las soluciones digestivo-descontaminantes pueden dañar las micobacterias.

La morfología y pigmentación de las colonias sólo pueden determinarse en medios sólidos. La ácido resistencia de las micobacterias puede variar dependiendo de la cepa, la edad del cultivo y otras variables. La uniformidad de la morfología microscópica en medio **BBL MGIT** no ha sido establecida.

Se pueden hacer subcultivos a partir de un tubo **MGIT** que tiene el frotis positivo para bacilos ácido resistentes en medios micobacterianos selectivos y no selectivos con el fin de obtener aislados para hacer la identificación y pruebas de susceptibilidad.

Los tubos **MGIT** de aspecto positivo pueden contener especies no micobacterianas. Las especies no micobacterianas pueden crecer más que las micobacterias presentes. Estos tubos **MGIT** deben se descontaminados y cultivados de nuevo.

Los tubos **MGIT** aparentemente positivos pueden contener una o más especies de micobacterias. Las micobacterias de crecimiento más rápido pueden desarrollar fluorescencia positiva antes que las micobacterias de crecimiento más lento; por lo tanto, es importante hacer subcultivos de los tubos **MGIT** positivos para asegurar la identificación exacta de todas las micobacterias presentes en la muestra.

Un volumen de muestra mayor que 0,5 mL puede aumentar la contaminación o de otro modo afectar en forma adversa el rendimiento de los tubos **MGIT**.

Debido a la riqueza del caldo **MGIT** y la naturaleza no selectiva del indicador **MGIT**, es importante seguir el procedimiento de digestión/descontaminación descrito para reducir la posibilidad de contaminación. Es importante seguir las instrucciones que acompañan el procedimiento para asegurar una recuperación óptima de micobacterias.

La utilización de la mezcla antibiótica **PANTA**, aunque es necesaria para todas las muestra no estériles, puede ejercer un efecto inhibitor sobre algunas micobacterias.

No se hicieron de forma rutinaria subcultivos terminales durante los estudios clínicos. Por tanto, la tasa actual de falsos negativos (definido como un tubo **MGIT** que permanece negativo durante el período de incubación de ocho semanas pero produce un organismo micobacteriano en subcultivo) no puede ser determinada en estos momentos.

Se hicieron estudios de cultivos sembrados con veintitrés especies (ATCC y cepas salvajes) de micobacteria utilizando niveles de inóculo desde 10^3 a 10^5 UFC/mL. Las siguientes especies dieron resultados positivos en el tubo **MGIT**:

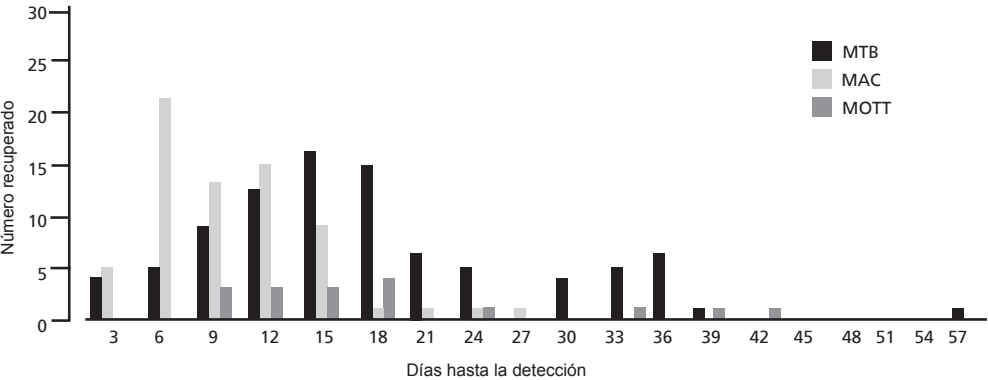
<i>M. africanum</i>	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. avium</i> Complex*	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. chelonae</i> *	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. flavescens</i> *	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. simiae</i> *	<i>M. vaccae</i>
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i>	

*Especies recuperadas durante la evaluación clínica del tubo **MGIT**.

Los estudios clínicos han demostrado la recuperación de micobacterias a partir de muestras del aparato respiratorio, aspirados gástricos, tejidos, heces y fluidos corporales estériles con la excepción de sangre; la recuperación de micobacterias de otros fluidos corporales no ha sido establecida para este producto.

VALORES ESPERADOS

Figura 1 – La distribución de las frecuencias de los tiempos de recuperación para muestras positivas en ensayo clínico del sistema **MGIT** se expone en la figura siguiente.



CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

El tubo **BBL MGIT** indicador de crecimiento micobacteriano fue evaluado en seis centros clínicos, que incluyeron laboratorios de salud pública y grandes hospitales de asistencia a pacientes agudos, situados en zonas geográficas muy diferentes. La población de los centros incluyó pacientes con infección por VIH, pacientes inmunocomprometidos y pacientes de trasplante. Los tubos **BBL MGIT** fueron comparados con el sistema radiométrico **BACTEC 460 TB**, el sistema de cultivo de micobacterias **BBL SEPTI-CHEK AFB** y medios de cultivo sólidos convencionales para la detección y recuperación de micobacterias de muestras clínicas (excepto sangre y orina). Un total de 2801 muestras fue analizado durante el estudio. La distribución por origen de las muestras analizadas fue: respiratorias (78%), gástricas (0,4%), fluidos corporales (9,8%), tejidos (7,0%), fecales (2,5%) y otras (2,4%). Un total de 318 muestras fue positivo, que representa 330 de los aislados recuperados durante el estudio. De estos 330 aislados, 253 (77%) fueron recuperados por los tubos **BBL MGIT**, 260 (79%) fueron recuperados por el **BACTEC 460TB** y el **BBL SEPTI-CHEK AFB**, y 219 (66%) fueron recuperados por medios sólidos convencionales. Los tubos **BBL MGIT** demostraron una tasa de positivos falsos del 0,5% (**MGIT** fluorescente, bacilos ácido resistentes ausentes). Los tubos **BBL MGIT** no recuperaron un 3,7% de los aislados que fue recuperado por uno o más de los sistemas de referencia (**BACTEC 460TB**, **BBL SEPTI-CHEK AFB** o medios sólidos convencionales). Aunque este porcentaje representa una pérdida potencial para la recuperación, no es indicativo de una determinación negativa falsa (consulte la sección "Limitaciones del procedimiento"). La utilización de un segundo medio, siguiendo las recomendaciones, aumentará la probabilidad de recuperar organismos micobacterianos. La tasa media de contaminación hallada en los tubos **BBL MGIT** fue 9,7%.

CENTROS BACTEC

Tabla 2 – Detección de aislados positivos para micobacteria en evaluaciones clínicas

Aislado	Aislados totales	Total MGIT	Sólo MGIT	Total BACTEC	Sólo BACTEC	Total CONV.	Sólo CONV.
MTB	113	91	2	98	7	92	6
MAC	99	76	9	86	13	57	3
<i>M. kansasii</i>	5	2	0	5	1	4	0
<i>M. fortuitum</i>	9	5	3	3	1	5	3
<i>M. chelonae</i>	2	0	0	2	1	1	0
<i>M. xenopi</i>	2	0	0	2	2	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	11	4	1	4	1	9	5
<i>M. flavescens</i>	2	1	0	2	1	0	0
Total MICO	244*	180*	15*	203	27	168	17

*NOTA: Catorce aislados SOLO MGIT no se incluyen en estos datos. Se hizo una identificación presuntiva sin confirmación final de la identificación.

CENTROS SEPTI-CHEK

Tabla 3 – Detección de aislados positivos para micobacteria en evaluaciones clínicas

Aislado	Aislados totales	Total MGIT	Sólo MGIT	Total SEPTI-CHEK	Sólo SEPTI-CHEK	Total CONV.	Sólo CONV.
MTB	30	25	1	29	2	26	0
MAC	34	26	5	28	2	25	0
<i>M. kansasii</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. gordonae</i>	2	2	2	0	0	0	0
Total MICO	67*	54*	9*	57	4	51	0

*NOTA: Cinco aislados SOLO MGIT no se incluyen en estos datos. Se hizo una identificación presuntiva sin confirmación final de la identificación.

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
245111	Tubos BD BBL MGIT indicadores de crecimiento micobacteriano, 4 mL, paquete de 25 tubos.
245113	Tubos BD BBL MGIT indicadores de crecimiento micobacteriano, 4 mL, caja de 100 tubos.
245116	BD BBL MGIT OADC, 15 mL, paquete de 6 frascos. Cada frasco es suficiente para 25 tubos MGIT .
220908	Medios inclinados BD BBL de Lowenstein-Jensen, paquete de 10 (tubos de 20 x 148 mm con tapa).
220909	Medios inclinados BD BBL de Lowenstein-Jensen, caja de 100 (tubos de 20 x 148 mm con tapa).
240862	Equipo de digestión/descontaminación de muestras BD BBL MycoPrep , diez frascos de 75 mL de solución NALC-NaOH y 5 paquetes con tampón fosfato.
240863	Equipo de digestión/descontaminación de muestras BD BBL MycoPrep , diez frascos de 150 mL de solución NALC-NaOH y 10 paquetes con tampón fosfato.
245114	Mezcla antibiótica BD BBL MGIT PANTA , liofilizada, paquete de 6 frascos. Cada frasco es suficiente para 25 tubos MGIT .
220959	Agar inclinados BD BBL Middlebrook y Cohn 7H10, caja de 100.
295939	Caldo BD BBL Middlebrook 7H9, 8 mL, paquete de 10 tubos.
221818	Solución salina normal BD BBL , 5 mL, paquete de 10.
221819	Solución salina normal BD BBL , 5 mL, caja de 100.
231729	BD BBL Taxo Differentiation Discs X, 50 discos por cartucho.

BIBLIOGRAFIA: Vea "References" en el texto en inglés.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvođač / Gyártó / Fabricante / Atkārūšy / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirkir / Producent / Producător / Производитель / Výrobca / Proizvođač / Tillverkare / Üretici / Виробник



Use by / Използвайте до / Spotføjti do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / Uputrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейн пайдалануа / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Использовать до / Použítte do / Uputrebiti do / Använd före / Son kulanma tarihi / Використати до line
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
 ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы)
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga)
 GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mėnesia beigas)
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutten av måneden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet av månaden)
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
 PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalooginumbr / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номер / Katalogo numeris / Kataloga numurs / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталогу / Katalogové číslo / Kataloški broj / Katalog numarası / Номер за каталогом



Authorized Representative in the European Community / Оторизиран представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropském společenství / Autoriseret repræsentant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Reprezentante autorizată en la Comunitat Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizuirani predstavnik u Europskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті екіл / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Reprezentante autorizată en Comunitate Europeia / Reprezentantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovano predstavništvo u Evropskoj uniji / Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Уповноважений представник у країнах ЄС



In vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostika meditsinaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In vitro Diagnostiku / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жүзрізетін медициналық диагностика аспабы / In vitro diagnostikos prietaisai / Medicinas ierices, ko lieto in vitro diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska pomoćna na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский пристрій для діагностики in vitro



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperatuuri piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / Laikymo temperatūra / Temperatūras ierobežojumi / Temperatuurlimiet / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ohraničenje teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sicaklık sınırlaması / Обмеження температури



Batch Code (Lot) / Код на партида / Kód (číslo) šarže / Batch-kode (lot) / Batch-Code (Charge) / Κωδικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kood / Numéro de lot / Lot (kod) / Tétel száma (lot) / Codice batch (lotto) / Топтама коды / Partijos numeris (LOT) / Partijas kods (laidiens) / Lot nummer / Batch-kode (parti) / Kod partii (seria) / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код партии (лот) / Kód série (šarža) / Kod serije / Partinummer (Lot) / Parti Kodu (Lot) / Код партії



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugeda kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Skaiti lietošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultați instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se bruksanvisningen / Kullanım Talimatları'na bakvurun / Див. інструкції за використання



Do not reuse / Не използвайте отново / Nepoužívejte opakovaně / Ikke til genbrug / Nicht wiederverwenden / Μην επαναχρησιμοποιείτε / No reutilizar / Mitte kasutada korduvalt / Ne pas réutiliser / Ne koristiti ponovo / Egyszer használatos / Non riutilizzare / Пайдаланбаңыз / Tik vienkartiniam naudojimui / Nelietot atkārtoti / Niet opnieuw gebruiken / Kun til engangsbruk / Ne stosować powtórnie / Năo reutilize / Nu refolosiți / Не использовать повторно / Nepoužívajte opakovane / Ne utpotebljavajte ponovo / Får ej återanvändas / Tekrar kulanmayın / Не використовувати повторно



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

Australian Sponsor:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde, NSW 2113 Australia

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2016 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.