

# **BD BACTEC™ MYCO/F-Sputa Culture Vials** Supplemented Middlebrook 7H9 Broth

English: pages 1 – 5 Español: páginas 18 – 22  
Français : pages 5 – 9 Dansk: side 22 – 26  
Deutsch: Seiten 9 – 13 Português: páginas 26 – 30  
Italiano: pagine 14 – 18 Svenska: sidan 31 – 34



PP101JAA(02)  
2015-05

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny vám 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 yhteys lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / 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 przedstawicielstwem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instrução. / 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 yerl BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

## INTENDED USE

**BACTEC™ MYCO/F-Sputa culture media** (modified Middlebrook 7H9 broth with CO<sub>2</sub>) with the addition of **BACTEC™ Supplement/F** and **BACTEC™ PANTA™/F** antibiotic mixture, when appropriate, is used with the **BACTEC™** Brand 9000MB fluorescent series instrument as a qualitative procedure for the *in vitro* culture and recovery of mycobacteria. Acceptable specimens to be used are digested decontaminated clinical specimens and sterile body fluids other than blood.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Since the mid-1980s and spread of the AIDS epidemic, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *Mycobacteria* other than tuberculosis (MOTT), especially *Mycobacterium avium* complex (MAC), have become resurgent. 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.<sup>1</sup> 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%.<sup>2</sup> 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.

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) have recommended that every effort must be made for 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.<sup>3</sup>

The **BACTEC 9000MB System** is designed for the rapid detection of mycobacteria in clinical specimens other than blood. The system includes a liquid culture medium (MYCO/F-Sputa Culture Vial), a growth supplement (Supplement/F) and an antibiotic supplement (**BACTEC PANTA/F**). **BACTEC Supplement/F** contains growth enhancers for mycobacteria, and is also used to reconstitute **BACTEC PANTA/F**. **BACTEC PANTA/F** contains antimicrobial agents used to suppress the growth of contaminating or normal flora microorganisms which may survive the decontamination process and is recommended as an addition with all non-sterile specimens. Each vial contains a sensor which can detect decreases in the dissolved oxygen in the medium resulting from microorganism metabolism and growth. The sensor is monitored by the instrument for increasing fluorescence which is proportional to decreasing dissolved oxygen content. A positive reading indicates the presumptive presence of viable mycobacteria in the vial. Detection is limited to microorganisms that will grow in the medium.

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Clinical specimens other than blood are collected and processed according to standard procedures for the recovery of mycobacteria. Processed specimens are inoculated with a needle and syringe into a **BACTEC MYCO/F-Sputa culture vial** which has been supplemented with **BACTEC Supplement/F** and/or **BACTEC PANTA/F** depending on the specimen type (refer to Procedure section). Patient information is entered into the system computer, and the vial is assigned a station through the bar code menu on the instrument. The vial is placed into the **BACTEC 9000MB System**, and is continuously incubated at 37 °C, with agitation once every ten minutes for maximum recovery. Respiration by viable aerobic microorganisms present in a MYCO/F-Sputa vial results in a net decrease of oxygen within that vial. An increase in the fluorescence of the vial sensor is caused by the depletion of dissolved oxygen. Each culture vial is monitored by the **BACTEC 9000MB System** every ten minutes for increasing fluorescence. Analysis of the rate of dissolved oxygen is used to determine if the vial is culture positive, i.e., the test sample contains viable organisms. Culture vials which remain negative for a minimum of 42 days (up to 56 days), and which show no visible signs of positivity are removed from the instrument and sterilized prior to discarding.

## REAGENTS

The **BACTEC MYCO/F-Sputa culture vials** contain the following active ingredients prior to processing:

List of Ingredients			
Processed Water . . . . .	40 mL	Ammonium Sulfate . . . . .	0.05% w/v
7H9 Middlebrook Broth Base. . . . .	0.47% w/v	Ferric Ammonium Citrate . . . . .	0.006% w/v
Casein Hydrolysate . . . . .	0.10% w/v	Polysorbate 80 . . . . .	0.0025% w/v
Supplement H . . . . .	0.30% w/v	Hemin . . . . .	0.0005% w/v
Glycerol . . . . .	0.10% w/v		

All **BACTEC** media are dispensed with added CO<sub>2</sub>. Composition may have been adjusted to meet specific performance requirements.

Prior to inoculation of respiratory and non-sterile specimens, each 40 mL vial of **BACTEC MYCO/F-Sputa medium** requires the addition of 2.0 mL of **BACTEC PANTA/F** Antibiotic Supplement solution as reconstituted with **BACTEC Supplement/F**. Prior to inoculation of sterile body fluids other than blood, each 40 mL vial of **BACTEC MYCO/F-Sputa medium** must be supplemented with 2.0 mL of **BACTEC Supplement/F**. Please see the Package Inserts for **BACTEC PANTA/F** (PP-102) and **BACTEC Supplement/F** (PP-103) for additional information.

## WARNINGS

**Precautions:** For *in vitro* diagnostic use.  
This Product Contains Dry Natural Rubber.

**POTENTIALLY INFECTIOUS TEST SPECIMEN. Observe “Universal Precautions”<sup>4,5</sup> and institutional guidelines when handling and disposing of infectious materials.**

Biosafety Level 2 practice, containment equipment, and facilities are recommended for preparing acid-fast stains and for culturing clinical specimens. For activities involving the propagation and manipulation of *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium* species grown in culture, Biosafety Level 3 practice, containment equipment, and facilities are required as recommended by the CDC.<sup>6</sup>

Prior to use, each vial should be examined for evidence of contamination such as cloudiness, bulging or depressed septum, or leakage. On rare occasions, the glass bottle neck may be cracked and the neck may break during removal of the flip-off cap or in handling. Also, a vial may exhibit incomplete crimping of the cap, as indicated when the metal edge at the bottom of the cap is not uniformly rolled under the neck finish of the bottle. In both cases the contents of the vials may leak or spill, especially if the vial is inverted. **DO NOT USE** any vial showing evidence of contamination, damage or incomplete crimping.

To minimize the potential of leakage during inoculation of specimen into culture vials, use a tuberculin syringe with a 25-gauge permanently attached needle. A one-handed inoculation technique and a suitable vial holder should be employed to prevent accidental needle stick injury. **Needles larger than 20-gauge must NOT be used.** For supplement addition, pressure release or subculturing, use of larger needles may permanently damage the vial septum, and may cause leakage.

**Positive culture vials for subculturing or staining, etc.:** Before sampling it is necessary to release gas which often builds up due to microbial metabolism. Sampling must be performed in a biological safety cabinet, and appropriate protective clothing, including gloves and masks, should be worn. See **"PROCEDURE"** section for more information on subculturing.

A contaminated vial could contain positive pressure. If a contaminated vial is sampled, gas and/or contaminated culture medium could escape from the vial, creating an aerosol hazard. Vial contamination may not be readily apparent.

Before discarding, sterilize all inoculated MYCO/F-Sputa vials by autoclaving.

#### LEAKING OR BROKEN VIALS

If an inoculated vial is found to be leaking or is accidentally broken, use the established procedure in your laboratory for dealing with mycobacterial spills. As a minimum, "Universal Precautions" should be employed. An approved form of respiratory protection is recommended. Any vial found to have minimal leakage confined to the septum and cap of the vial may be topically disinfected using a mycobactericidal disinfectant, followed by 70% isopropyl alcohol. If this should occur within the instrument, a potential for an aerosol exposure exists. Turn off the instrument and close the doors immediately. Vacate the affected area. Contact your facility's Safety or Infection Control Officer(s). Determine the necessity of turning off or modifying the settings of the air handling units serving the affected area. Do not return to the area until any potential aerosols have settled or have been removed by appropriate ventilation. Becton Dickinson should be notified by calling 1-800-544-7434 in the U.S.A. Guidelines for proper handling of accidental mycobacterial contamination due to breakage of culture tubes or broth suspensions have been issued by the CDC.<sup>6</sup>

#### STORAGE INSTRUCTIONS

**MYCO/F-Sputa culture vials:** Store at 2° – 25 °C, in a dry location out of direct light.

**DO NOT** use after expiration date.

**BACTEC PANTA/F Antibiotic Supplement:** Store unreconstituted **BACTEC PANTA/F** at 2 – 8 °C. Once reconstituted, it should be used immediately or stored frozen at -20 to -70 °C for up to six months. **DO NOT** thaw and refreeze. Protect from light. Overheating must be avoided.

**DO NOT** use after expiration date.

#### SPECIMEN PROCESSING

Sputum or other respiratory specimens must be digested, decontaminated and concentrated prior to inoculation into MYCO/F-Sputa culture vials. The N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide method is recommended.<sup>6,7,8</sup> Alternatively, the **BBL™ MycoPrep™** Kit may be used for processing the specimen. Other decontamination methods have not been tested in conjunction with MYCO/F-Sputa medium. After centrifugation (≥ 3,000 x g, 15 min) the sediment should be re-suspended in sterile phosphate buffer, pH 6.8.

Processing of non-respiratory specimens other than blood should be conducted according to the Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> CDC Manual, or as defined in your individual laboratory procedure manual.

#### PROCEDURE

**MYCO/F-Sputa medium must be used with a BACTEC 9000MB fluorescent series instrument.**

**Materials Provided:** BACTEC MYCO/F-Sputa culture vials, **BACTEC PANTA/F** Antibiotic Supplement and **BACTEC** Supplement/F Media Supplement.

**Materials Required but Not Provided:** Centrifuge; Biological Safety Cabinet; Autoclave; CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C, **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; sterile transfer pipettes; sterile tuberculin syringe with 25-gauge needle; mycobactericidal disinfectant; 70% isopropyl alcohol; mycobacterial agar or egg-based medium; 7H9 broth, sterile saline; Quality Control organisms (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC™ 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841; and *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478); microscope and materials for staining slides.

#### INOCULATION OF MYCO/F-SPUTA CULTURE VIALS

1. Remove the flip-off cap from the **BACTEC** vial top and inspect the vial for cracks, contamination, excessive cloudiness, and bulging or indented septum. **DO NOT USE** if any defect is noted.

2. Label culture vial with specimen identification.

3. Reconstitute the lyophilized **BACTEC PANTA/F** vial with 10 mL of **BACTEC** Supplement/F using a syringe with a **Luer-Lok™** brand tip fitted with a 25-gauge needle. Needles larger than 20-gauge **MUST NOT** be used. Larger needles may permanently damage the vial septum. Mix the contents well. Visually inspect the vial contents to insure dissolution of the **BACTEC PANTA/F** Antibiotic Supplement.

4. For respiratory and non-sterile specimens, MYCO/F-Sputa medium vials to be inoculated must be supplemented with 2.0 mL of the reconstituted **BACTEC PANTA/F** solution. Supplemented vials should be inoculated within two hours of the **BACTEC PANTA/F** solution addition. Before inoculating with **BACTEC PANTA/F** solution, swab the septum with 70% isopropyl alcohol. A tuberculin syringe equipped with a 25-gauge, non-removable needle is recommended. A one-handed inoculation technique and a suitable vial holder should be employed to prevent accidental needle stick injury. For tissue or other particulate specimens, it is recommended to use a larger needle (20 – 22 gauge) and a syringe with a **Luer-Lok** brand or similar type tip.

For sterile body fluids other than blood (e.g. synovial fluid, peritoneal), **BACTEC** MYCO/F-Sputa medium vials must be supplemented with 2.0 mL of **BACTEC** Supplement/F prior to inoculation. Before inoculating with **BACTEC** Supplement/F, swab the septum with 70% isopropyl alcohol. A tuberculin syringe equipped with a 25-gauge, non-removable needle is recommended. A one-handed inoculation technique and a suitable vial holder should be employed to prevent accidental needle stick injury.

5. Aseptically inject 0.5 mL of processed specimen per vial using a tuberculin syringe with a 25-gauge needle. The insertion and withdrawal of the needle should be done in a straight-line motion, avoiding any side-to-side motions which could permanently damage the septum. Swab the septum with mycobactericidal disinfectant, followed by 70% isopropyl alcohol. Inoculated vials should be placed in the **BACTEC** 9000MB System as soon as possible, but certainly within the same day as the specimen is decontaminated, processed, and inoculated into **BACTEC** MYCO/F-Sputa culture vials.

At this time, conventional media such as Lowenstein-Jensen or 7H10/7H11 should be inoculated.

6. Vials entered into the instrument will be automatically tested for the duration of the testing protocol. Positive vials will be identified by the **BACTEC** 9000MB System (see the **BACTEC** 9000MB User's Manual, MA-0092). The sensor inside the vial may not appear visibly different in positive or negative vials; however, the **BACTEC** 9000MB System can determine a difference in sensor fluorescence.

7. Positive vials should be subcultured and an acid-fast smear prepared.

Processing an instrument-positive vial:

- Remove the vial from the instrument.
- In biological safety cabinet, vent the vial to equilibrate vial pressure with atmosphere.
- Invert vial to mix contents.
- Remove aliquot from vial ( app. 0.1 mL) for stain preparations (AFB and Gram stains).
- Inspect smear and preparations. Report preliminary results only after acid fast stain evaluation.

If **AFB positive**, subculture to solid media and report as: instrument-positive, AFB positive, ID pending.

If microorganisms other than acid-fast bacilli are present, report as: instrument positive, AFB Negative, Contaminated.

If no microorganisms are present on the smears, re-enter the vial into the instrument as an ongoing negative vial and allow to complete test protocol. No reportable result.

Subcultures for identification and drug susceptibility testing may be performed using fluid from the **BACTEC MYCO/F-Sputa** culture vials.

**Subculturing and Vial Re-Entry:** Subculturing must be performed in a biological safety cabinet, and appropriate clothing, including gloves and masks, should be worn. Prior to subculturing, place the vial in an upright position, and place an alcohol wipe over the septum. To release any positive pressure in the vial which could be caused by growth of contaminants, insert a sterile 25-gauge (or smaller) needle equipped with an appropriate filter or pledget through the alcohol wipe and septum. The needle should be removed after any pressure is released and before sampling the vial for subculture. The insertion and withdrawal of the needle should be done in a straight-line motion, avoiding any side-to-side motions which could permanently damage the septum. To subculture the vented vial, invert to mix contents well and insert a new syringe, with a 25-gauge needle, to remove culture medium for further processing. **Do not re-cap the needle. Discard needles and syringes in a puncture-resistant biohazard container.**

The user may wish to return a vial with a negative smear result to the instrument for continued monitoring through the testing protocol.

At the end of six weeks incubation, perform a visual check of all instrument-negative vials. If the vial appears visually positive (i.e., turbid, with possible clumps of mycobacteria) it should be subcultured, acid-fast stained, and treated as a presumptive positive, provided the acid-fast stain result is positive. If the vial shows no signs of positivity it should be sterilized prior to discarding.

## QUALITY CONTROL

Quality Control Certificates are provided with each carton of media.

It is recommended that each new shipment or lot of **BACTEC MYCO/F-Sputa** culture media be tested with the ATCC control organisms identified in the chart below as a positive control and an uninoculated vial as a negative control.

Organism	Range of Time-to-detection (days)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 to 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 to 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 to 12

To prepare the positive control vial:

1. Grow the organism in 7H9 broth.
2. Prepare a #1 McFarland ( $\approx 10^7$  CFU/mL) suspension of the organism using sterile saline.
3. Dilute the suspension to  $10^4$  CFU/mL using sterile saline.
4. Inoculate 1 mL of this suspension into a **BACTEC MYCO/F-Sputa** culture vial which has been supplemented with 2.0 mL of reconstituted **BACTEC PANTA/F**. **Inoculum of 1 mL is to be used for Quality Control organisms only.**

The positive and negative control vials should be scanned into the instrument and tested. The positive control vial should be detected as instrument positive within the range given in the above chart. The negative control should remain negative. If either of these vials do not give the expected results, do not use the media until you have contacted Technical Services at 1-800-638-8663 (United States only).

For information on quality control for the **BACTEC 9000MB** System, refer to the **BACTEC 9000MB** User's Manual (MA-0092).

## RESULTS

A culture-positive sample is determined by the **BACTEC 9000MB** System and confirmed by an acid-fast smear. A positive result indicates the presumptive presence of viable microorganisms in the vial.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

### Contamination

Care must be taken to prevent external contamination of the sample during collection, digestion, decontamination, and inoculation into the **BACTEC** vial. Due to the richness of the medium and the non-selective nature of fluorescent detection of oxygen consumption, breakthrough contamination may occur. Digestion and decontamination procedures must be carefully performed to reduce breakthrough contamination by non-mycobacterial organisms. Test only indicated specimen types. A contaminated vial will give a positive instrument reading, but will not indicate a relevant clinical result. Such a determination must be made by the user, based on such factors as acid-fast smear result, type of organism recovered, occurrence of the same organism in multiple cultures, patient history, etc. (Refer to the **BACTEC 9000MB** User's Manual, MA-0092, for vial re-decontamination procedure.)

Decontamination with the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) method is recommended. Other decontamination methods have not been tested in conjunction with **BACTEC MYCO/F-Sputa** medium. Digestant-decontaminants may have harmful effects on mycobacteria.

### Specimen Type

**BACTEC MYCO/F-Sputa** culture vials with the addition of **BACTEC Supplement/F** and **BACTEC PANTA/F**, when appropriate, are to be used for the culture and recovery of digested decontaminated clinical specimens and sterile body fluids other than blood. The minimum detection level of this test may vary according to the mycobacterial species present.

**DO NOT USE BACTEC MYCO/F-Sputa** medium culture vials for the recovery of mycobacteria from blood.

Pleural fluids can contain red and white blood cells<sup>10</sup> which have a high rate of oxidative metabolism which can result in false positivity.

### General Considerations

Detection of mycobacterial species in clinical specimens 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. Adherence to procedural instructions is critical for optimum recovery of mycobacteria. Contamination with saprophytic mycobacteria in tap water or other laboratory reagents and equipment may cause false positive results.

Optimum recovery of isolates will be achieved by adding 0.5 mL of processed and re-suspended specimen inoculum to each vial. The severity of the digestion and decontamination protocol used to process the specimen can also affect recovery and time-to-detection.

Mycobacteria may vary in acid-fastness depending on strain, age of culture and other variables. All positive vials as indicated by the instrument or appearing turbid at end of testing protocol should be subcultured to both selective and non-selective mycobacterial media. Non-mycobacterial species may overgrow mycobacteria present. These culture vials should be re-decontaminated and re-cultured. (Refer to the **BACTEC 9000MB** User's Manual, MA-0092, for vial re-decontamination procedure.)

Colonial morphology and pigmentation characteristics can only be determined on solid media. Further identification tests may be performed to determine mycobacterial speciation from a positive **BACTEC MYCO/F-Sputa** vial.

**BACTEC MYCO/F-Sputa** vials which appear positive may contain one or more species of mycobacteria and/or other non-mycobacterial species. Identification of mycobacteria present requires subculture to a solid medium and additional procedures to identify organisms present. The consistency of microscopic morphology in **BACTEC MYCO/F-Sputa** has not been established.

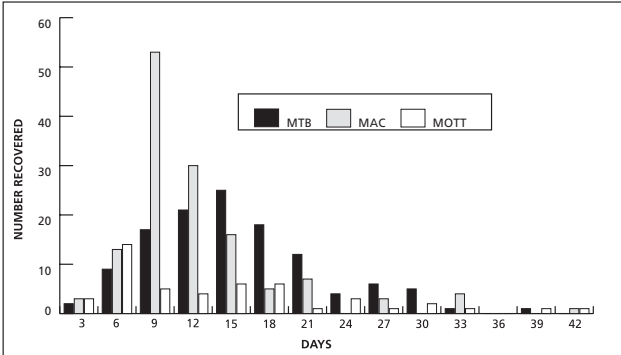
**BACTEC MYCO/F-Sputa** vials are incubated at 37 °C potentially precluding the recovery of mycobacteria requiring other incubation temperatures (e.g., *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Recovery of such organisms requires additional culture methods. Organisms with special growth requirements (e.g., *M. haemophilum*) may not be recovered in **BACTEC MYCO/F-Sputa** when incubated at the appropriate temperature. The following isolates were detected as positive in the **BACTEC 9000MB** System using **BACTEC MYCO/F-Sputa** during both internal studies and/or clinical trials: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium xenopi*.

The use of **BACTEC PANTA/F** Antibiotic Supplement, 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 MYCO/F-Sputa culture vial that remained negative throughout the six-week incubation period was subcultured and grew a mycobacterial organism, cannot be determined at this time.

## EXPECTED RESULTS

Frequency distribution of recovery times for clinical trial respiratory specimens positive in the **BACTEC 9000MB** System is illustrated in the following figure.



## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Respiratory Specimens

The **BACTEC 9000MB** System was evaluated at four clinical sites which included public health laboratories as well as large acute care hospitals in geographically diverse areas. The site populations included patients infected with HIV, immunocompromised patients, and transplant patients. The **BACTEC 9000MB** System was compared to both the **BACTEC 460TB** radiometric system as well as conventional solid growth media for the recovery and detection of mycobacteria from respiratory specimens. A total of 3135 respiratory specimens were tested during the trials. The total number of pathogenic mycobacteria positive isolates recovered in the study was 348. Of these positives, 292 (84%) were recovered in the **BACTEC 9000MB** System, 260 (75%) were recovered in the **BACTEC 460TB** radiometric system and 178 (51%) were recovered using solid media (Lowenstein-Jensen). The **BACTEC 9000MB** System and solid media combined recovered 89.6% of the total pathogenic isolates. For non-pathogenic MOTT\* (Mycobacteria Other Than Tuberculosis), the total number of positive isolates recovered in the study was 40. Of these positives, 16 (40%) were recovered in the **BACTEC 9000MB** System, 24 (60%) were recovered in the **BACTEC 460TB** radiometric system, and five (13%) were recovered in the solid media. The **BACTEC 9000MB** System and solid media combined recovered 50% of the total non-pathogen MOTT.

(\*Non-pathogenic MOTT included *M. goodii*, *M. abscessus*, *M. terrae*.)

The **BACTEC 9000MB** System failed to recover 1.8% of the pathogenic isolates which were recovered in one or more of the reference systems (**BACTEC 460TB** 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 Section). Use of a second medium, as recommended, will increase the probability of recovery of mycobacterial organisms. The **BACTEC 9000MB** System demonstrated a 1.5% false positive rate (instrument-positive, smear and/or subculture negative). The overall breakthrough contamination rate for the **BACTEC 9000MB** System was 6.5%.

### Summary of BACTEC 9000MB System Respiratory isolate recovery during clinical trials

Species Isolated	Total Isolates	TOTAL 9000MB	9000MB ONLY	TOTAL 460TB	460TB ONLY	TOTAL LJ	LJ ONLY
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
<i>M. avium</i> Complex	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. goodii</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. species (other)</i>	5	5	2	1	0	3	0
ALL ISOLATES	388	308	76	284	56	183	15

### Non-Respiratory Specimens

In a separate study at a large teaching hospital, 803 non-respiratory specimens were tested with the **BACTEC MYCO/F-Sputa** culture medium, **BACTEC 12B** culture medium, and conventional medium (Lowenstein-Jensen). The total number of pathogenic mycobacteria positive isolates recovered in the study was 38. Of these positive isolates, the **BACTEC 9000MB** System recovered 29 (76.3%), 30 (78.9%) were recovered in the **BACTEC 460TB** System, and 24 (63.2%) were recovered by conventional medium (Lowenstein-Jensen). The **BACTEC 9000MB** System and solid media combined recovered 89.5% of the total pathogenic isolates. Total positive specimens (pathogenic and non-pathogenic mycobacteria) were distributed among the following sources: gastric (5.1%), sterile body fluids other than blood (17.9%), stool (10.3%), superficial skin/wound drainage (5.1%), tissue (53.8%), and urine (7.7%). The following isolates

were detected as positive in the **BACTEC** 9000MB System using MYCO/F-Sputa during this clinical trial: *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. bovis*. The overall false positive rate (instrument-positive, smear and/or subculture negative) was 5.0%. Due to the variety of specimens collected and tested, the false positive rate varied significantly from the rate previously reported for respiratory specimens. The breakthrough contamination rate for normally sterile specimens (i.e. tissue and sterile body fluids other than blood) ranged from 4.7% – 18.9%; non-sterile specimens (i.e., gastric, stool, urine, superficial skin/wound drainage) ranged from 8.2% – 73.9%. Overall breakthrough contamination rate was 14.9%.

## REFERENCES

1. Bloom, B.R. and Murray, C.J.L., 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. *New England Journal of Medicine* 324:1332-1338.
3. Tenover, F.C., et al., 1993. The resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready? *Journal of Clinical Microbiology* 31:767-770
4. Recommendations for preventing transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus to patients during exposure-prone invasive procedures. *MMWR* 1991, Vol. 40, No. RR-8.
5. Bloodborne pathogens. Code of Federal Regulations, Title 29, Part 1910.1030, Federal Register 1991, 56:64175-64182.
6. Kent, P.T. et al. *Public Health Mycobacteriology; A Guide for the Level III Laboratory*, U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service/ Centers for Disease Control, Atlanta, GA 30333, 1985. pp. 16-19.
7. Kubica, G.P. et al. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1963, 87:775-779.
8. Kubica, G.P. et al. Comments on the use of the new mycolytic agent N-acetyl-L-cysteine as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1964. 89:284- 286.
9. Master, Ronald N. (ed) *Mycobacteriology*, 1994, Section 3, in Isenberg, Henry D. (ed): *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1. Washington, D.C., American Society for Microbiology.
10. Krieg, A.F., 1979. Cerebrospinal fluid and other body fluids, p. 635-679. In J.B. Henry (ed), *Todd-Sanford-Davidsohn, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory methods*, 16th ed., vol. 1, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or [www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds).

# BD Flacons de culture BACTEC MYCO/F-Sputa Bouillon Middlebrook 7H9 enrichi

Français

## APPLICATION

Les milieux de culture **BACTEC** MYCO/F-Sputa (bouillon Middlebrook 7H9 modifié, avec CO<sub>2</sub>), enrichis avec le **BACTEC** Supplément/F et le mélange d'antibiotiques **BACTEC PANTA/F** comme nécessaire lorsqu'ils sont utilisés avec l'appareil **BACTEC** 9000MB de la série à fluorescence constituent une méthode qualitative de culture *in vitro* et de mise en évidence des mycobactéries. Les échantillons appropriés à utiliser correspondent aux échantillons cliniques décontaminés et digérés et aux liquides physiologiques à l'exception du sang.

## RESUME ET EXPLICATION

Depuis le milieu des années 1980 et depuis la propagation de l'épidémie du SIDA, on assiste à une recrudescence de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ainsi que d'autres mycobactéries (MOTT), en particulier le complexe *Mycobacterium avium* (MAC). De 1985 à 1992, le nombre de cas de tuberculose confirmés a augmenté de 18 %. La tuberculose tue encore actuellement un nombre estimé à environ 3 millions de personnes par an à l'échelle mondiale, ce qui en fait la principale maladie infectieuse mortelle.<sup>1</sup> Entre 1981 et 1987, l'étude 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 %.<sup>2</sup> En plus de la recrudescence de MTB, des souches de MTB résistantes à divers antibiotiques (MDR-TB) sont devenues un problème de plus en plus pressant. Les retards pris au niveau des laboratoires pour cultiver, identifier et rapporter les cas de MDR-TB ont contribué au moins en partie à l'extension de cette maladie.

Les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ont recommandé que les laboratoires fassent tous les efforts possibles pour utiliser les méthodes les plus rapides actuellement disponibles pour établir un diagnostic des mycobactéries. Ces recommandations mentionnent l'utilisation conjointe d'un milieu liquide et d'un milieu solide pour la culture des mycobactéries.<sup>3</sup>

Le Système **BACTEC** 9000MB a été conçu de façon à assurer une détection rapide des mycobactéries dans des échantillons cliniques autres que sanguins. Le système comprend un milieu de culture liquide (flacon de culture MYCO/F-Sputa), un supplément de culture (Supplément/F) et un supplément antibiotique (**BACTEC PANTA/F**). Le **BACTEC** Supplément/F contient des facteurs favorisant la croissance des mycobactéries et sert aussi à reconstituer le **BACTEC PANTA/F**. Le **BACTEC PANTA/F** contient des agents antibactériens servant à supprimer la croissance des microorganismes contaminants ou normaux de la flore qui auraient pu survivre au processus de décontamination et son addition est conseillée avec tous les échantillons non-stériles. Chaque flacon contient un senseur qui peut détecter une réduction de la concentration d'oxygène dissous dans le milieu suite à l'activité métabolique des microorganismes et leur croissance. Le senseur est lu par l'appareil pour rechercher une augmentation de la fluorescence qui est proportionnelle à la diminution de la teneur en oxygène du milieu. Une lecture positive indique une présence possible de microorganismes viables dans le flacon. La détection se limite aux microorganismes pouvant se développer dans le milieu.

## PRINCIPES DE LA METHODE

Des échantillons cliniques autres que sanguins sont prélevés et traités suivant les procédures standard en application pour la récupération des mycobactéries. Les échantillons traités sont inoculés à l'aide d'une aiguille et d'une seringue dans le flacon de culture **BACTEC** MYCO/F-Sputa auquel a été ajouté le **BACTEC** Supplément/F et/ou **BACTEC PANTA/F** selon le type de l'échantillon (se référer à la section Méthode). L'information concernant le malade est entré dans l'ordinateur du système, et une position est assignée au flacon par l'intermédiaire de la barre de menu sur l'appareil. Le flacon est placé dans le Système **BACTEC** 9000MB et est incubé à 37 °C de façon continue et agité à intervalles de 10 minutes pour maximiser la récupération. La respiration des microorganismes aérobies viables présents dans le flacon de milieu MYCO/F-Sputa enrichi provoque une diminution nette de la quantité d'oxygène présent dans le flacon. La réduction de la quantité d'oxygène dissous dans le milieu provoque une augmentation de la fluorescence du senseur présent dans le flacon. Toutes les 10 minutes le Système **BACTEC** 9000MB analyse chaque flacon quant à l'augmentation de la fluorescence. L'analyse du taux de réduction de l'oxygène dissous permet à l'appareil de déterminer si le flacon est une culture positive, c'est-à-dire que l'échantillon contient des organismes viables. Les flacons de culture qui demeurent négatifs pendant au moins 42 jours (au plus 56 jours) et qui ne montrent aucun signe visible d'être positif sont ôtés de l'instrument et stérilisés avant d'être jetés.

## REACTIFS

Avant analyse, les flacons de culture **BACTEC** MYCO/F-Sputa contiennent les réactifs suivants :

### Liste des composants

(Les pourcentages correspondent au poids par rapport au volume)

Eau traitée	40 mL	Sulfate d'ammonium	0,05 %
Base de bouillon Middlebrook 7H9	0,47 %	Citrate d'ammonium ferrique	0,006 %
Hydrolysat de caséine	0,10 %	Polysorbate 80	0,0025 %
Supplément H	0,30 %	Hémine	0,0005 %
Glycérol	0,10 %		

Tous les milieux **BACTEC** sont fournis avec l'addition de CO<sub>2</sub>. La composition peut avoir été modifiée pour se conformer à des exigences spécifiques de fonctionnement.

Avant l'introduction d'échantillons respiratoires non-stériles, chaque flacon de 40 mL de milieu **BACTEC MYCO/F-Sputa** requiert l'addition de 2,0 mL de la solution **BACTEC PANTA/F** préalablement reconstituée avec le **BACTEC Supplément /F**. Avant d'être inoculé par des liquides physiologiques autres que le sang, chaque flacon de 40 mL de milieu **BACTEC MYCO/F-Sputa** requiert l'addition de 2,0 mL de **BACTEC Supplément/F**. S.V.P. se référer à la notice accompagnant le produit **BACTEC PANTA/F** (PP-102) et celle du **BACTEC Supplément/F** (PP-103) pour des informations supplémentaires.

#### PRECAUTIONS A PRENDRE

**Précautions** : pour le diagnostic *in vitro*.

Ce produit contient du caoutchouc naturel séché.

**ÉCHANTILLONS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Observer toutes les "Précautions Universelles"<sup>4,5</sup> et les directives de votre institution lors de la manipulation et l'élimination des matériaux infectieux.**

On recommande les pratiques de sécurité biologique de niveau 2, des équipements et des installations de contention pour préparer les colorations acido-résistantes et pour la culture des échantillons cliniques. Pour les activités comprenant la manipulation et la propagation de *Mycobacterium tuberculosis* ou d'espèces de *Mycobacterium* mises en cultures, les pratiques de sécurité biologique de niveau 3, des équipements et des installations de contention telles que recommandées par les CDC sont nécessaires.<sup>6</sup>

Avant utilisation, il convient d'examiner les flacons pour vérifier l'absence de contamination, de turbidité, de bouchon protubérant ou en dépression ou de fuite. Occasionnellement, le goulot du flacon en verre peut être fêlé et donc se briser quand la capsule de protection est enlevée ou pendant les manipulations. De plus, un flacon peut de temps à autre ne pas être suffisamment bien bouché, ce qui se fait voir si le bord inférieur métallique du capuchon ne pince pas intégralement le goulot du flacon. Dans les deux cas, le contenu du flacon risque de fuir ou de se répandre, en particulier si le flacon est retourné. **NE PAS UTILISER** un flacon présentant des signes de contamination, d'être abîmé ou d'avoir un mauvais pas de vis.

Afin de minimiser les risques de fuite pendant l'ensemencement de l'échantillon dans les flacons de culture, utiliser une seringue à tuberculine avec une aiguille non-amovible de calibre 25. Une technique d'inoculation utilisant une seule main et un support à flacons adéquat devrait être employée afin de réduire les risques de piqûres accidentelles. **Les aiguilles de calibre supérieur à 20 ne doivent pas être utilisées.** L'utilisation d'aiguilles de fort calibre pour l'addition de supplément, le relâchement de pression ou pour faire des repiquages, peut endommager le septum du flacon de manière permanente et causer une fuite.

**Les flacons de culture positifs pour les repiquages ou les colorations, etc.** : Avant d'effectuer un prélèvement, il est nécessaire de relâcher les gaz qui se sont accumulés du fait du métabolisme microbien. Les prélèvements doivent être effectués dans une hotte biologique de sécurité et il convient de porter des vêtements protecteurs appropriés y compris masque et gants. Voir la section **METHODE** pour plus d'informations sur le repiquage.

Un flacon contaminé peut être sous pression. Si un flacon contaminé est prélevé, des gaz et/ou le milieu de culture contaminé peuvent s'échapper du flacon et créer ainsi un risque biologique sous forme d'aérosol. La contamination des flacons peut ne pas être facilement décelable.

Avant de les jeter, stériliser à l'autoclave tous les flacons MYCO/F-Sputa inoculés.

#### FLACONS BRISES OU AYANT UNE FUITE

Si un flacon inoculé présente une fuite ou est accidentellement brisé, suivre les protocoles en vigueur dans votre laboratoire pour traiter les déversements de liquide contenant des mycobactéries. Au minimum, les « Précautions Universelles » devraient être suivies. Un équipement approuvé de protection respiratoire est recommandé. Tout flacon présentant une fuite minime, située seulement au niveau de son septum et de son capuchon, peut être désinfecté de manière topique à l'aide d'un désinfectant mycobactéricide suivi d'alcool isopropylique à 70 %. Si cela devait arriver dans l'instrument, il existerait alors un risque potentiel d'exposition à un aérosol. Arrêter l'appareil et fermer les portes tout de suite. Quitter les lieux. Communiquer avec le responsable de la sécurité ou du contrôle des infections de votre établissement. Établir la nécessité d'arrêter ou de modifier le fonctionnement des unités de ventilation déservant les lieux affectés. Ne pas retourner sur les lieux avant que tout aérosol potentiel ne se soit déposé ou n'ait été éliminé à l'aide d'une ventilation appropriée. Il faut informer BD Diagnostics en contactant le représentant local de BD approprié. Des recommandations pour le traitement adéquat d'une contamination accidentelle avec des mycobactéries suite au bris d'un tube de culture ou de bouillon ont été émises par les CDC.<sup>9</sup>

#### CONSEILS DE STOCKAGE

**FLACONS DE CULTURE MYCO/F-SPUTA** : conserver entre 2 et 25 °C, dans un endroit sec à l'abri de la lumière directe.

**NE PAS** utiliser après la date de péremption.

**SUPPLÉMENT ANTIBIOTIQUE BACTEC PANTA/F** : conserver le **BACTEC PANTA/F** non reconstitué à 2 – 8 °C. Une fois reconstitué il doit être utilisé immédiatement ou conservé entre -20 et -70 °C pendant au plus six mois. **NE PAS** décongeler et recongeler. Le conserver à l'abri de la lumière. Toute surchauffe doit être évitée.

**NE PAS** utiliser après la date de péremption.

#### TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les crachats et autres échantillons respiratoires doivent être digérés, décontaminés et concentrés avant d'être inoculés dans les flacons de milieu MYCO/F-Sputa. La méthode basée sur l'utilisation de la combinaison N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium est recommandée.<sup>6,7,8</sup> Comme alternative, il est possible d'utiliser le kit **BBL MycoPrep** pour traiter l'échantillon. Les autres méthodes de décontamination n'ont pas été testées en combinaison avec le milieu MYCO/F-Sputa. Après centrifugation (≥ 3.000 x g, 15 min) le culot devrait être resuspendu dans un tampon phosphate stérile, pH 6,8.

L'analyse des échantillons non respiratoires autres que le sang doit être effectuée conformément au Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> au manuel des CDC, ou aux directives propres à votre institution.

#### METHODE

**Le milieu MYCO/F-Sputa doit être utilisé avec un appareil BACTEC 9000MB de la série à fluorescence.**

**Matériels fournis** : les flacons de culture **BACTEC MYCO/F-Sputa**, le supplément antibiotique **BACTEC PANTA/F** et le supplément de culture **BACTEC Supplément/F**.

**Matériels requis, mais non fournis** : centrifuge ; hotte biologique de sécurité ; autoclave ; incubateur sous CO<sub>2</sub> à 37 °C ; tubes **Falcon** 50 mL pour centrifugation ; hydroxyde de sodium à 4 % ; solution de citrate de sodium à 2,9 %. Poudre de N-acétyl-L-cystéine ; tampon phosphate, pH 6,8 ; appareil d'agitation au vortex ; pipettes de transfert stériles ; seringue à tuberculine avec une aiguille de calibre 25 ; désinfectant mycobactéricide ; alcool isopropylique à 70 % ; gélose mycobactérienne ou milieu à base d'oeuf ; bouillon 7H9 Solution saline physiologique stérile ; organismes de contrôle de la qualité (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294 ; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841 ; *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478) ; microscope et équipement de coloration des lames.

#### INOCULATION DES FLACONS DE CULTURE MYCO/F-SPUTA

1. Retirer le capuchon du flacon **BACTEC** et vérifier l'absence de fissure, de contamination, de turbidité excessive, de bouchon protubérant ou en dépression. **NE PAS UTILISER** si on note un défaut.
2. Etiqueter le flacon de culture avec le numéro d'identification de l'échantillon.
3. À l'aide d'une seringue avec un embout **Luer-Lok** pourvu d'une aiguille de calibre 25, reconstituer le flacon lyophilisé de **BACTEC PANTA/F**, avec 10 mL de **BACTEC Supplément/F**. Des aiguilles de calibre supérieur à 20 **ne doivent pas être utilisées.** Les aiguilles de fort calibre peuvent endommager le septum du flacon de manière permanente. Bien mélanger le contenu. Examiner visuellement le contenu du flacon pour s'assurer que le supplément antibiotique **BACTEC PANTA/F** est complètement dissous.
4. Les flacons de milieu MYCO/F-Sputa à inoculer doivent être additionnés de 2,0 mL de la solution reconstituée de **BACTEC PANTA/F** pour les échantillons respiratoires et non stériles. Les flacons devraient être inoculés moins de deux heures après l'addition de la solution de **BACTEC PANTA/F**. Avant d'inoculer

avec la solution de **BACTEC PANTA/F**, essuyer le septum avec de l'alcool isopropylique à 70 %. Une seringue à tuberculine avec une aiguille non-amovible de calibre 25 est recommandée. Une technique d'inoculation utilisant une seule main et un support à flacons adéquat devrait être employée afin de réduire les risques de piqûres accidentelles. Pour des échantillons de tissus ou d'autres échantillons particuliers, il est conseillé d'utiliser une aiguille plus large (calibre de 20 – 22) et une seringue de la marque **Luer-Lok** ou à embout du même type.

Pour les liquides physiologiques autres que le sang (par exemple, liquide synovial, péritonéal), les flacons de milieu **BACTEC MYCO/F-Sputa** requièrent l'addition de 2,0 mL de **BACTEC Supplément/F** avant d'être inoculés. Avant l'inoculation avec le **BACTEC Supplément/F**, essuyer le septum avec de l'alcool isopropylique à 70 %. Une seringue à tuberculine équipée d'une aiguille non amovible de calibre 25 est conseillée. Une technique d'inoculation utilisant une seule main et un support à flacons adéquat devrait être employée afin de réduire les risques de piqûre accidentelle.

- De manière aseptique, injecter 0,5 mL de l'échantillon pré-traité dans chaque flacon au moyen d'une seringue à tuberculine pourvue d'une aiguille de calibre 25. L'insertion et le retrait de l'aiguille doivent être faits avec un mouvement rectiligne, en évitant tout mouvement de torsion qui pourrait endommager le septum de manière permanente. Essuyer le septum avec un désinfectant mycobactéricide puis avec de l'alcool isopropylique à 70 %. Les flacons inoculés devraient être placés le plus tôt possible dans le Système **BACTEC 9000MB**. A tout le moins, ils doivent être placés dans l'appareil le jour même où l'échantillon a été décontaminé, traité et inoculé dans le milieu **BACTEC MYCO/F-Sputa**.

A ce moment, des milieux conventionnels tels que le Lowenstein-Jensen ou le 7H10/7H11 peuvent aussi être inoculés.

- Les flacons introduits dans l'appareil seront automatiquement analysés pour toute la durée du protocole d'analyse. L'identification des flacons positifs sera effectuée par le Système **BACTEC 9000MB** (voir le manuel d'utilisation du Système **BACTEC 9000MB, MA-0092**). Le senseur à l'intérieur du flacon peut ne pas présenter de différence d'aspect visible entre un flacon positif et un négatif, cependant le Système **BACTEC 9000MB** peut détecter une différence dans la fluorescence du senseur.
- Les flacons positifs devraient faire l'objet d'un repiquage et un frottis destiné à une coloration pour bactéries acido-résistantes devrait être préparé. Traitement d'un flacon identifié comme positif par l'appareil :
  - Sortir le flacon de l'appareil.
  - Aérer le flacon dans une hotte biologique de sécurité pour mettre le contenu du flacon à la pression atmosphérique.
  - Retourner le flacon pour mélanger son contenu.
  - Prélever un aliquot du flacon (environ 0,1 mL) pour préparer les colorations (colorations AFB et de Gram).
  - Inspecter le frottis et les préparations. Faire un rapport des résultats préliminaires seulement après avoir évalué la coloration acido-résistante.

**Si l'AFB est positive**, faire un repiquage sur un milieu solide et noter ce flacon comme : positif pour l'appareil, positif pour AFB, ID en cours.

**Si des microorganismes autres que des bacilles acido-résistants** sont présents, noter : positif pour l'appareil, négatif pour AFB, contaminé.

**Si aucun microorganisme** n'est présent sur les frottais, remettre le flacon dans l'instrument en tant que flacon négatif et finir le processus d'analyse. Aucun résultat négatif n'est à noter.

Les repiquages pour les tests d'identification et de susceptibilité aux antibiotiques peuvent être effectués en se servant du liquide des flacons de culture **BACTEC MYCO/F-Sputa**.

**Repiquage et retour du flacon dans l'appareil** : Les repiquages doivent être effectués à l'intérieur d'une hotte de sécurité biologique et il convient de porter des vêtements appropriés, dont des gants et un masque. Avant le repiquage, poser le flacon debout et placer un coton imbibé d'alcool sur le bouchon. Pour relâcher la pression à l'intérieur d'un flacon suite à la croissance de contaminants, insérer une aiguille stérile de calibre 25 (ou plus petit), munie d'un filtre adéquat, à travers le coton imbibé d'alcool et le bouchon. L'aiguille doit être retirée après relâchement de la pression et avant de faire un prélèvement pour repiquage. L'insertion et le retrait de l'aiguille doivent être faits avec un mouvement rectiligne, en évitant tout mouvement de torsion qui pourrait endommager le septum de manière permanente. Pour effectuer un repiquage du flacon aéré, retourner le flacon afin de bien mélanger le contenu, et insérer une nouvelle seringue avec aiguille de calibre 25 pour enlever du milieu de culture pour un traitement supplémentaire. **Ne pas recapuchonner l'aiguille. Jeter les aiguilles et les seringues dans un contenant pour matériel présentant un risque biologique, résistant aux perforations.**

L'utilisateur peut désirer remettre dans l'appareil un flacon ayant donné un frottis négatif pour en continuer le suivi au moyen du protocole d'analyse.

A la fin de six semaines d'incubation, effectuer un examen visuel de tous les flacons reconnus comme négatifs par l'appareil. Si un flacon apparaît comme visiblement positif (c-à-d., turbide, avec une possibilité d'agrégats de mycobactéries), un repiquage et une coloration pour bactéries acido-résistantes devraient être faits. Ce flacon devrait être traité comme un résultat positif présomptif advenant un résultat de coloration positif. En absence de toute indication positive, il devrait être stérilisé et jeté.

## CONTROLE DE QUALITE

Des certificats de contrôle de qualité sont fournis avec chaque carton de flacons.

Il est recommandé de tester chaque nouvelle livraison ou nouveau lot de milieu culture **BACTEC MYCO/F-Sputa** avec les organismes de contrôle **ATCC** qualifiés de contrôles positifs dans la liste ci-dessous et avec un flacon non-inoculé comme témoin négatif.

Organisme	Délai en jours pour la détection
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 à 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 à 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 à 12

Pour préparer le flacon de contrôle positif :

- Cultiver l'organisme dans le bouillon 7H9.
- Préparer une suspension du #1 de McFarland ( $\approx 10^7$  UFC/mL) de l'organisme considéré dans un sérum physiologique stérile.
- Diluer la suspension à  $10^4$  UFC/mL à l'aide du sérum physiologique.
- Inoculer 1 mL de cette solution dans un flacon de milieu de culture **BACTEC MYCO/F-Sputa** auquel a été ajouté 2,0 mL de la solution reconstituée **BACTEC PANTA/F**. **Seulement les organismes de contrôle de la qualité ont un volume d'inoculum de 1 mL.**

Les flacons des contrôles positifs et négatifs doivent être scannés par l'appareil et testés. Les contrôles positifs doivent être identifiés comme positifs par l'appareil dans les délais indiqués dans le tableau ci-dessus. Le contrôle négatif doit rester négatif. Si l'un quelconque de ces flacons ne donne pas les résultats escomptés, n'utilisez pas les milieux tant que vous n'avez pas contacté le représentant local de BD approprié.

Pour toute information concernant le contrôle de la qualité pour le Système **BACTEC 9000MB**, voir le guide d'utilisateur du **BACTEC 9000MB (MA-0092)**.

## RESULTATS

Un échantillon donnant une culture positive est identifié par le Système **BACTEC 9000MB** et confirmé par un frottis pour bactéries acido-résistantes. Un résultat positif indique la présence possible de microorganismes dans le flacon.

## LIMITES DE LA METHODE

### Contamination

Il convient de veiller à ne pas contaminer l'échantillon au cours du prélèvement, de la digestion, de la décontamination et de l'ensemencement dans le flacon **BACTEC**. En raison de la richesse du milieu et de la nature non sélective de la méthode de détection par fluorescence de la consommation d'oxygène, des contaminations de novo peuvent se produire. Les méthodes de digestion et de décontamination doivent être effectuées avec soin afin de réduire le risque de contamination incidente par des organismes autres que des mycobactéries. Ne tester que les types d'échantillons indiqués. Un flacon contaminé donnera un résultat positif mais n'indiquera pas un résultat clinique significatif. Ceci peut être déterminé par l'utilisateur en fonction de facteurs tels que le résultat du

frottis pour coloration de bactéries acido-résistantes, le type de microorganisme recueilli, la présence du même microorganisme dans plusieurs cultures, les antécédents du patient, etc. (Pour la méthode de décontamination répétée du flacon, voir le guide d'utilisateur du **BACTEC** 9000MB, MA-0092.)

La méthode de décontamination avec la combinaison N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est recommandée. Les autres méthodes de décontamination n'ont pas été testées en combinaison avec le milieu **BACTEC** MYCO/F-Sputa. Les décontaminants par digestion peuvent avoir des effets néfastes sur les mycobactéries.

#### Type de l'échantillon

Les flacons de culture **BACTEC** MYCO/F-Sputa enrichis avec le **BACTEC** Supplément/F et le **BACTEC** PANTA/F comme nécessaire, doivent servir à la culture et la mise en évidence d'échantillons cliniques décontaminés et digérés et de liquides physiologiques stériles autres que le sang. Le niveau minimum de détection de ce test peut varier en fonction des espèces de mycobactéries présentes.

**NE PAS UTILISER** les flacons de milieu de culture MYCO/F-Sputa pour la mise en évidence de mycobactéries à partir du sang.

Le liquide pleural peut contenir des globules rouges et blancs sanguins<sup>10</sup> lesquels possèdent un taux élevé de métabolisme oxydatif qui peut donner des résultats faussement positifs.

#### Considérations générales

La détection des espèces de mycobactéries dans des échantillons cliniques dépend du nombre d'organismes présents dans l'échantillon, de la méthode d'obtention de l'échantillon, de facteurs propres au malade tels que la présence de symptômes et les traitements antérieurs, et la méthode de traitement de l'échantillon. Une adhésion aux instructions protocolaires est essentielle à une récupération optimale des mycobactéries. Des contaminations par des mycobactéries saprophytes provenant de l'eau du robinet ou d'autres réactifs et équipements courants dans un laboratoire peuvent donner des résultats faussement positifs.

Une mise en évidence optimale des isolats peut être accomplie en ajoutant 0,5 mL d'échantillon pré-traité et resuspendu dans chaque flacon. La rigueur des protocoles de digestion et de décontamination utilisés pour traiter les échantillons peut aussi affecter la mise en évidence et le temps de détection.

La coloration des mycobactéries acido-résistantes peut varier en fonction de la souche, de l'âge de la culture et de diverses autres variables. Tous les flacons positifs reconnus comme tels par l'appareil ou apparaissant turbides à la fin du protocole d'analyse doivent être repiqués et sur des milieux sélectifs et sur des milieux non sélectifs des mycobactéries. Les espèces n'appartenant pas aux mycobactéries peuvent croître plus vite que celles de mycobactéries présentes. Ces flacons de culture doivent être redécontaminés et repiqués (se référer au guide d'utilisateur **BACTEC** 9000MB, MA-0092 pour le protocole de redécontamination des flacons).

Les caractéristiques de pigmentation et morphologiques des colonies peuvent souvent être déterminées sur un milieu solide. D'autres tests d'identification peuvent être effectués pour déterminer l'espèce mycobactérienne à partir d'un flacon MYCO/F-Sputa positif.

Les flacons **BACTEC** MYCO/F-Sputa qui apparaissent positifs peuvent contenir une ou plusieurs espèces de mycobactéries et/ou d'espèces n'appartenant pas aux mycobactéries. L'identification des mycobactéries présentes nécessite le repiquage sur des milieux solides et des analyses supplémentaires pour identifier les organismes présents. La cohérence de la morphologie microscopique dans **BACTEC** MYCO/F-Sputa n'a pas été établie.

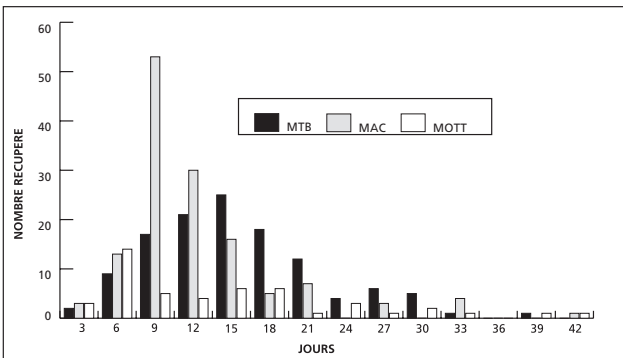
Les flacons **BACTEC** MYCO/F-Sputa sont incubés à 37 °C ce qui exclut potentiellement la récupération de mycobactéries nécessitant des températures d'incubation différentes (soit *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). L'obtention de ces organismes demande des méthodes de culture supplémentaires. Des organismes avec des besoins de croissance spécifiques (tel que *M. haemophilum*) peuvent ne pas être récupérés dans **BACTEC** MYCO/F-Sputa lorsqu'ils sont incubés à la température appropriée. Les isolats suivants ont été identifiés comme positifs par le Système **BACTEC** 9000MB en combinaison avec des flacons de culture **BACTEC** MYCO/F-Sputa aussi bien au cours d'analyses internes que d'essais cliniques : *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium xenopi*.

L'utilisation du supplément antibiotique **BACTEC** PANTA/F, 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. Par conséquent, le taux réel de faux négatifs défini comme étant le flacon MYCO/F-Sputa qui reste négatif pendant la totalité des six semaines d'incubation mais qui après repiquage développe un organisme mycobactérien, n'a pas pu être déterminé.

#### RESULTATS ATTENDUS

La distribution de la fréquence des délais de récupération pour les échantillons d'essais cliniques établis comme positifs par le Système **BACTEC** 9000MB est présentée dans la figure ci-dessous :



#### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

##### Echantillons respiratoires

Le Système **BACTEC** 9000MB a été testé dans quatre sites cliniques différents comprenant des laboratoires de santé publique et des grands hôpitaux spécialisés en divers lieux géographiques. Les populations du site comprenaient les malades infectés par le virus VIH, les malades dont le système immunitaire est compromis et les malades ayant subi des transplantations. Le Système **BACTEC** 9000MB a été comparé au système radiométrique **BACTEC** 460TB et aux milieux de culture solides conventionnels pour la récupération et la détection des mycobactéries dans les échantillons respiratoires. Un total de 3135 échantillons respiratoires ont été analysés pendant ces essais. Le nombre total d'isolats positifs de mycobactéries pathogènes récupérés pendant cette étude était de 348. De ceux-ci, 292 (84 %) ont été obtenus à partir du Système **BACTEC** 9000MB, 260 (75 %) ont été récupérés avec le système radiométrique **BACTEC** 460TB et 178 (51 %) par milieux solides (Lowenstein-Jensen). Le Système le **BACTEC** 9000MB et les milieux solides pris ensemble ont récupéré 89,6 % de la totalité des isolats pathogènes. Pour les isolats MOTT<sup>11</sup> (Mycobactéries autres que celle de la tuberculose) non pathogènes, le nombre total des isolats positifs récupérés au cours de l'étude était de 40. De ceux-ci, 16 (40 %) avait été récupérés par le Système **BACTEC** 9000MB, 24 (60 %) l'avaient été par le système radiométrique



**BACTEC 460TB**, et cinq (13 %) provenaient des milieux solides. Le Système **BACTEC 9000MB** et les milieux solides combinés comptaient pour 50 % du total de MOTT non pathogènes récupérés.

(\*Les MOTT non pathogènes comprennent *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. terrae*.)

Le Système **BACTEC 9000MB** n'a pas réussi à récupérer 1,8 % des isolats pathogènes qui l'avaient été par un ou plusieurs des autres systèmes de référence (**BACTEC 460TB** ou milieux solides traditionnels). Tandis que ce pourcentage représente un manque réel de matériel récupéré, il ne correspond pas à un faux négatif (se référer à la section « Limites de la méthode »). L'utilisation d'un second milieu, comme il est recommandé, augmentera la probabilité de récupération des organismes mycobactériens. Le Système **BACTEC 9000MB** a donné 1,5 % de faux positifs (identifiés comme positifs par l'appareil mais donnant un frottis et un repiquage négatifs). Le taux de contamination de novo pour le Système **BACTEC 9000MB** était de 6,5 %.

#### RESUME DE LA RECUPERATION DES ISOLATS RESPIRATOIRES PAR LE SYSTEME BACTEC 9000MB LORS DES ESSAIS CLINIQUES

Espèces Isolées	Total des Isolats	TOTAL 9000MB	9000MB SEULEMENT	TOTAL 460TB	460TB SEULEMENT	TOTAL LJ	LJ SEULEMENT
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
Complexe <i>M. avium</i>	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. gordonae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
Espèces de <i>M.</i> (autres)	5	5	2	1	0	3	0
ISOLATS TOTAL	388	308	76	284	56	183	15

#### Les échantillons non-respiratoires

Dans une étude indépendante dans un grand hôpital d'enseignement des soins tertiaires, 803 échantillons non respiratoires ont été analysés avec le milieu de culture **BACTEC MYCO/F-Sputa**, le milieu de culture **BACTEC 12B** et un milieu traditionnel (Lowenstein-Jensen). Le nombre total d'isolats positifs de mycobactéries pathogènes décelés au cours de l'étude était de 38. De ces isolats positifs, 29 (76,3 %) ont été décelés par le système **BACTEC 9000MB**, 30 (78,9 %) par le système **BACTEC 460TB** et 24 (63,2 %) par le milieu traditionnel (Lowenstein-Jensen). Le système **BACTEC 9000MB** et le milieu solide pris ensemble ont récupéré 89,5 % des isolats pathogènes totaux. L'ensemble des échantillons positifs (pathogènes et non-pathogènes) se répartissait suivant les origines suivantes : gastrique (5,1 %), liquides physiologiques autres que le sang (17,9 %), fèces (10,3 %), exsudat de blessure/cutané superficiel (5,1 %), tissus (53,8 %) et urine (7,7 %). Les isolats suivants ont été identifiés comme positifs par le système **BACTEC 9000MB** utilisant **MYCO/F-Sputa** dans cet essai clinique : *M. tuberculosis*, le complexe *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* et *M. bovis*. Le taux global de faux positifs (positif d'après l'instrument mais donnant un frottis et/ou un repiquage négatif) était de 5,0 %. En raison de la diversité des échantillons prélevés et analysés, le taux de faux positifs diffère significativement du taux rapporté précédemment pour les échantillons respiratoires. Le taux de contamination de novo pour les échantillons normalement stériles (soit, tissus et liquides physiologiques autres que le sang) variait de 4,7 % à 18,9 % ; les échantillons non-stériles (soit, gastriques, fèces, urine, exsudat de blessure/cutané superficiel) avaient un taux compris entre 8,2 % et 73,9 %. Le taux global de contamination de novo était de 14,9 %.

**REFERENCES:** voir la rubrique "References" du texte anglais

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD.

## **BD BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen** Angereicherte Middlebrook 7H9-Bouillon

Deutsch

#### VERWENDUNGSZWECK

Gegebenenfalls mit **BACTEC Supplement/F-** und **BACTEC PANTA/F-Antibiotikamischung** angereicherte **BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturmedien** (modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillon mit CO<sub>2</sub>), werden in Verbindung mit dem **BACTEC 9000MB-Gerät** der Fluoreszenz-Serie als qualitatives Verfahren für die *in-vitro* Kultivierung und Isolierung von Mykobakterien verwendet. Akzeptable Proben hierzu sind digerierte, dekontaminierte, klinische Proben sowie andere sterile Körperflüssigkeiten als Blut.

#### ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Seit Mitte der achtziger Jahre und der Ausbreitung der AIDS-Epidemie ist es zu einem Wiederanstieg des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) und der nichttuberkulösen Mykobakterien (MOTT), insbesondere des *Mycobacterium avium*-Komplexes (MAC), gekommen. Zwischen 1985 und 1992 stieg die Zahl der mitgeteilten MTB-Fälle um 18 %. Tuberkulose ist weltweit immer noch für mehr als 3 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich und ist somit die Infektionskrankheit mit der häufigsten Todesursache.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup> Zusätzlich zu diesem Wiederanstieg von MTB ist MTB mit multipler Arzneimittelresistenz (MDR-TB) zu einem zunehmenden Problem geworden. Laborbedingte Verzögerungen des Wachstums, der Identifizierung und der Befundmitteilung dieser MDR-TB-Fälle haben wenigstens teilweise zur Ausbreitung der Erkrankung beigetragen.

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 eines flüssigen sowie eines festen Mediums zur Kultivierung der Mykobakterien.<sup>3</sup>

Das **BACTEC 9000MB-System** dient zum schnellen Nachweis von Mykobakterien in anderen klinischen Proben als Blut. Das System besteht aus einem flüssigen Kulturmedium (**MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen**), einem Wachstumssupplement (**Supplement/F**) und einem Antibiotika-Supplement (**BACTEC PANTA/F**).

**BACTEC Supplement/F** enthält wachstumsfördernde Substanzen für Mykobakterien und wird auch zur Rekonstitution von **BACTEC PANTA/F** verwendet.

**BACTEC PANTA/F** enthält antimikrobielle Substanzen zur Unterdrückung des Wachstums der normalen Begleitflora oder kontaminierender Mikroorganismen, die das Dekontaminierungsverfahren überleben und wird als Zusatz zu allen nichtsterilen Proben empfohlen. Jedes Fläschchen enthält einen Sensor, der die durch Metabolismus und Wachstum von Mikroorganismen hervorgerufene Abnahme des gelösten Sauerstoffs im Medium nachweist. Das System überprüft den Sensor auf eine Zunahme der Fluoreszenz, die in einem proportionalen Verhältnis zum abnehmenden Gehalt des gelösten Sauerstoffs steht. Eine positive Messung deutet auf die vermutliche Anwesenheit lebensfähiger Mykobakterien im Fläschchen hin. Der Test ist auf die im Medium zum Wachstum fähigen Mikroorganismen beschränkt.

## VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Andere klinische Proben als Blut werden gemäß Standardverfahren für die Isolierung von Mykobakterien entnommen und verarbeitet. Verarbeitete Proben werden mit einer Nadel und Spritze in ein **BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen** inokuliert, das, je nach Probenart (s. „Verfahren“), mit **BACTEC Supplement/F** und/oder **BACTEC PANTA/F** angereichert wurde. Patienteninformationen werden in den Systemcomputer eingegeben und das Fläschchen wird mit Hilfe des Barcode-Menüs auf dem System einer Station zugeordnet. Das Fläschchen wird in das **BACTEC 9000MB-System** geladen und kontinuierlich bei 37 °C inkubiert, wobei das Fläschchen in zehn-Minuten-Abständen geschüttelt wird, um eine maximale Ausbeute zu erzielen. Die Respiration der in einem MYCO/F-Sputa-Fläschchen vorhandenen lebensfähigen aeroben Mikroorganismen führt zu einer Abnahme des Sauerstoffgehalts in diesem Fläschchen. Aufgrund der Abnahme des gelösten Sauerstoffs kommt es zu einer Intensivierung der Fluoreszenz im Fläschchensensor. Jedes Kulturfläschchen wird vom **BACTEC 9000MB-System** in zehn-Minuten-Abständen auf zunehmende Fluoreszenz überprüft. Durch Analyse der Abnahmegeschwindigkeit des gelösten Sauerstoffs wird bestimmt, ob das Fläschchen positiv ist, d.h., ob die Probe lebensfähige Organismen enthält. Kulturfläschchen, die mindestens 42 Tage (und bis zu 56 Tagen) negativ bleiben und keine sichtbaren Anzeichen von Positivität aufweisen, werden aus dem Gerät entnommen und vor der Entsorgung sterilisiert.

## REAGENZIEN

Die **BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen** enthalten vor der Verarbeitung die folgenden aktiven Bestandteile:

### Liste der Bestandteile:

% w/v = Gewichtsprozent (weight per volume)

Demineralisiertes Wasser	..... 40 mL	Ammoniumsulfat	..... 0,05 % w/v
7H9 Middlebrook Bouillonbasis	... 0,47 % w/v	Ammonium Eisen(III)-citrat	..... 0,006 % w/v
Casein-Hydrolysat	..... 0,10 % w/v	Polysorbat 80	..... 0,0025 % w/v
Supplement H	..... 0,30 % w/v	Häm in	..... 0,0005 % w/v
Glycerol	..... 0,10 % w/v		

Alle **BACTEC**-Medien werden mit CO<sub>2</sub>-Zusatz abgefüllt. Die Zusammensetzung kann gemäß speziellen Leistungsanforderungen abgeändert worden sein.

Vor der Inokulation von Proben aus dem Respirationstrakt und nichtsterilen Proben muß jedes 40-mL-Fläschchen **BACTEC MYCO/F-Sputa-Medium** mit 2,0 mL **BACTEC PANTA/F** Antibiotika-Supplement-Lösung, die mit Supplement/F rekonstituiert wurde, angereichert werden. Jedem 40-mL-Fläschchen **BACTEC MYCO/F-Sputa-Medium** müssen vor der Inokulation von sterilen Körperflüssigkeiten außer Blut 2,0 mL **BACTEC Supplement/F** zugesetzt werden. Zusätzliche Anweisungen dazu enthalten die Packungsbeilagen für **BACTEC PANTA/F** (PP-102) und **BACTEC Supplement/F** (PP-103).

## WARNUNG

**Sicherheitshinweise:** zur *in-vitro*-Diagnostik.

Dieses Produkt enthält trockenen Naturkautschuk.

**POTENTIELL INFEKTÖSE TESTPROBE. Bei der Handhabung und Entsorgung von infektiösen Materialien "Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen"<sup>4,5</sup> und institutsinterne Richtlinien beachten.**

Die Anfertigung von säurefesten Färbungen und die Kultivierung klinischer Proben sollten nach den Richtlinien und unter Anwendung der physikalischen Sicherheitsvorkehrungen der Biologischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden. Verfahren, die die Fortpflanzung und Handhabung von *Mycobacterium tuberculosis* oder anderen in Kultur gezüchteter Mykobakterien einschließen, müssen laut Empfehlungen der CDC nach den Richtlinien und unter Anwendung der physikalischen Sicherheitsvorkehrungen der Biologischen Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden.<sup>6</sup>

Vor Gebrauch muß jedes Fläschchen auf Anzeichen von Kontamination, wie z.B. Trübung, Wölbung oder Einbeulung des Septums, oder undichte Stellen, untersucht werden. In seltenen Fällen kann der gläserne Fläschchenhals einen Sprung haben und beim Entfernen des Abrißdeckels oder während der Handhabung des Fläschchens brechen. Außerdem kann ein Fläschchen unvollständiges Crimpen des Deckels aufweisen, was daran zu erkennen ist, daß der Metallrand am unteren Ende des Deckels nicht gleichmäßig unter den Flaschenhals gerollt ist. In beiden Fällen ist es möglich, daß der Fläschcheninhalt ausläuft oder verschüttet wird, besonders wenn das Fläschchen umgedreht wird. Fläschchen, die Anzeichen von Kontamination, Beschädigung oder unvollständigem Crimpen aufweisen, **NICHT VERWENDEN**.

Um potentielle Sickerverluste bei der Inokulation von Proben in die Kulturfläschchen so weit wie möglich auszuschließen, sollten Tuberkulinspritzen mit fest eingesetzten Nadeln der Stärke 25 (US) verwendet werden. Bei der Inokulation sollte mit einer Hand gearbeitet und ein geeigneter Fläschchenhalter verwendet werden, um eine versehentliche Nadelstichverletzung zu vermeiden. **Nadeln mit einer Stärke von über 20 (US) dürfen NICHT verwendet werden.** Bei der Zugabe von Supplement, bei Druckablaß oder bei der Anlage von Subkulturen können stärkere Nadeln das Fläschchenseptum permanent schädigen und zu Sickerverlust führen.

**Positive Kulturfläschchen zur Anlage von Subkulturen oder für Färbungen usw.:** Vor der Probenentnahme muß Gas abgelassen werden, das sich häufig als Folge mikrobiellen Stoffwechsels ansammelt. Die Probenentnahme sollte in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt werden, und Schutzkleidung, einschließlich Handschuhen und Gesichtsmaske, sollte getragen werden. Der Abschnitt **VERFAHREN** enthält weitere Informationen zur Subkultivierung.

Kontaminierte Fläschchen können Überdruck erzeugen. Wird zur Probenentnahme ein kontaminiertes Fläschchen verwendet, kann Gas und/oder kontaminiertes Kulturmedium aus dem Fläschchen entweichen und zu Gefährdung durch Aerosole führen. Die Kontamination eines Fläschchens ist nicht unbedingt evident.

Vor der Entsorgung müssen alle inokulierten MYCO/F-Sputa-Fläschchen autoklaviert werden.

## UNDICHTE ODER ZERBROCHENE FLÄSCHCHEN

Wenn ein inokuliertes Fläschchen ausläuft oder versehentlich zerbrochen wird, die in Ihrem Labor geltenden Verfahrensrichtlinien für den Umgang mit verschüttetem mykobakteriellen Material anwenden. Es sollten jedoch zumindest die „allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“ beachtet werden. Eine genehmigte Methode des Atemschutzes wird empfohlen. Fläschchen mit nur minimalem Sickerverlust, der sich auf das Septum und den Deckel beschränkt, können an den betroffenen Stellen mit mykobakterizidem Desinfektionsmittel und danach mit 70%igem Isopropylalkohol desinfiziert werden. Falls dies im Innern des Gerätes geschieht, besteht die Möglichkeit einer Gefahrenwirkung durch Aerosole. Gerät sofort abschalten, Türen schließen und den betroffenen Arbeitsbereich räumen. Verständigen Sie den (die) für Ihr Labor zuständige(n) Sicherheits- oder Infektionskontrollbeauftragte(n). Entscheiden Sie, ob es notwendig ist, die Einstellung der raumlufttechnischen Anlage, die diesen Bereich mit Luft versorgt, zu verändern oder diese abzuschalten. Bleiben Sie diesem Bereich fern, bis die möglicherweise durch die Aerosole entstandene Gefahr vorüber ist. Verständigen Sie einen Vertreter von Becton Dickinson. Die CDC haben Richtlinien zum richtigen Vorgehen im Falle einer versehentlichen mykobakteriellen Kontamination auf Grund eines zerbrochenen Fläschchens mit Kulturmedium oder Bouillionsuspension veröffentlicht.<sup>6</sup>

## LAGERUNG

**MYCO/F-SPUTA-KULTURFLÄSCHCHEN:** Die Fläschchen müssen trocken bei 2 – 25 °C und vor direkter Lichteinstrahlung geschützt gelagert werden.

**NICHT** nach dem Verfallsdatum verwenden.

**BACTEC PANTA/F ANTIBIOTIKA-SUPPLEMENT:** Nicht rekonstituiertes **BACTEC PANTA/F** bei 2 – 8 °C lagern. Nach der Rekonstitution ist das Supplement sofort zu verwenden; andernfalls kann es bei -20 bis -70 °C bis zu 6 Monaten gefroren gelagert werden. **NICHT** auftauen und erneut einfrieren. Vor Licht geschützt aufbewahren. Übermäßige Wärmeinwirkung ist zu vermeiden.

**NICHT** nach dem Verfallsdatum verwenden.

## PROBENVERARBEITUNG

Sputum oder andere Proben aus dem Respirationstrakt müssen vor der Inokulation in die MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen digeriert, dekontaminiert und konzentriert werden. Die Anwendung der N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid-Methode wird empfohlen.<sup>6,7,8</sup> Als Alternative kann das **BBL MycoPrep**-Kit zur Probenverarbeitung verwendet werden. Andere Dekontaminierungsmethoden wurden in Verbindung mit MYCO/F-Sputa-Medium nicht getestet. Nach der Zentrifugation ( $\geq 3.000 \times g$ , 15 min) sollte das Sediment in sterilem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 6,8 resuspendiert werden.

Bei der Verarbeitung von anderen Proben als Blut, die nicht aus dem Respirationstrakt stammen, sind die im Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> CDC Manual oder im Verfahrenshandbuch des jeweiligen Labors definierten Verfahren zu befolgen.

## VERFAHREN

**MYCO/F-Sputa-Medium muß mit dem BACTEC 9000MB-Gerät der Fluoreszenz-Serie verwendet werden.**

**Mitgelieferte Materialien:** BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen, BACTEC PANTA/F-Antibiotika-Supplement und BACTEC Supplement/F zur Medienanreicherung.

**Zusätzlich benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien:** Zentrifuge; Biologische Sicherheitswerkbank; Autoklav; CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C; 50-mL-Falcon-Zentrifugenröhrchen ; 4%ige Natriumhydroxidlösung; 2,9%ige Natriumcitratlösung, N-Acetyl-L-Cystein-Pulver; Phosphatpuffer, pH 6,8; Vortexmischer; sterile Transferpipetten; sterile Tuberkulinspritze mit Nadel der Stärke 25 (US); mykobakterizides Desinfektionsmittel; 70%iger Isopropylalkohol; Mykobakterien-Agar oder Medium auf Eibasis; 7H9-Bouillon, sterile NaCl-Lösung; Qualitätskontrollorganismen (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841; und *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478); Mikroskop und Materialien zur Färbung von Objektträgern.

## INOKULATION VON MYCO/F-SPUTA-KULTURFLÄSCHCHEN

1. Den Abrißdeckel auf dem BACTEC-Fläschchen entfernen und das Fläschchen auf Sprünge, Kontamination, starke Trübung, und Wölbung oder Einbeulung des Septums überprüfen. Beschädigte Fläschchen **NICHT VERWENDEN**.
2. Kulturfläschchen mit Probenidentifizierung beschriften.
3. Mit Hilfe einer Spritze mit **Luer-Lok**-Kegel und einer Nadel der Stärke 25 das lyophilisierte BACTEC PANTA/F-Fläschchen mit 10 mL BACTEC Supplement/F rekonstituieren. Nadeln mit einer Stärke von mehr als 20 **dürfen nicht** verwendet werden. Stärkere Nadeln können das Fläschchenseptum permanent schädigen. Den Inhalt gut mischen. Den Fläschcheninhalt visuell untersuchen, um sicherzugehen, daß sich das BACTEC PANTA/F-Antibiotika-Supplement aufgelöst hat.
4. Für Proben aus dem Respirationstrakt oder nichtsterile Proben müssen die zu inokulierenden Fläschchen mit MYCO/F-Sputa-Medium mit 2,0 mL rekonstituierter BACTEC PANTA/F-Lösung angereichert werden. Die angereicherten Fläschchen sollten innerhalb von 2 Stunden nach der Zugabe der BACTEC PANTA/F-Lösung inokuliert werden. Vor der Inokulation mit BACTEC PANTA/F-Lösung das Septum mit 70%igem Isopropylalkohol abwischen. Eine Tuberkulinspritze mit einer fest eingesetzten Nadel der Stärke 25 wird empfohlen. Bei der Inokulation sollte mit einer Hand gearbeitet und ein geeigneter Fläschchenhalter verwendet werden, um eine versehentliche Nadelstichverletzung zu vermeiden. Es wird empfohlen, bei Gewebe- oder anderen Partikulatproben eine größere Nadel (Stärke 20 – 22) und eine Spritze mit einem **Luer-Lok**- oder ähnlichem Kegel zu verwenden.

Bei anderen sterilen Körperflüssigkeiten außer Blut (z.B. Synovial- oder Peritonealflüssigkeit) sind die BACTEC MYCO/F-Sputa-Medienfläschchen vor der Inokulation mit 2,0 mL BACTEC Supplement/F anzureichern. Vor der Inokulation mit BACTEC Supplement/F das Septum mit 70%igem Isopropylalkohol abwischen. Es wird eine Tuberkulinspritze mit einer fest eingesetzten Nadel der Stärke 25 empfohlen. Zur Vermeidung einer versehentlichen Nadelstichverletzung ist eine einhändige Inokulationsmethode und ein geeigneter Fläschchenhalter einzusetzen.

5. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze mit fest eingesetzter Nadel der Stärke 25 pro Fläschchen 0,5 mL der behandelten Probe aseptisch injizieren. Das Einstechen und Zurückziehen der Nadel sollte mit einer geradlinigen Bewegung ohne Drehungen geschehen, da diese das Septum permanent schädigen können. Das Septum mit mykobakterizidem Desinfektionsmittel und danach mit 70%igem Isopropylalkohol abwischen. Inokulierte Fläschchen sollten so rasch wie möglich in das BACTEC 9000MB-System gestellt werden, auf jeden Fall aber an dem Tag, an dem die Probe dekontaminiert, behandelt und in die BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen inokuliert wurde.

Zu diesem Zeitpunkt sollten herkömmliche Medien, wie z.B. Löwenstein-Jensen oder 7H10/7H11 ebenfalls inokuliert werden.

6. Im System befindliche Fläschchen werden für die Gesamtdauer der Testprotokollaufnahme automatisch getestet. Positive Fläschchen werden vom BACTEC 9000MB-System als solche identifiziert (siehe Bedienungsanleitung des BACTEC 9000MB-Systems, MA-0092). Der Sensor wird sich zwar in positiven und negativen Fläschchen nicht sichtbar verändern, doch das BACTEC 9000MB-System kann Fluoreszenzveränderungen im Sensor feststellen.
7. Von positiven Fläschchen sollte eine Subkultur angelegt und ein Ausstrich für säurefeste Bakterien angefertigt werden.

Verarbeitung eines auf dem Gerät positiv erscheinenden Fläschchens:

- a) Fläschchen aus dem Gerät nehmen.
- b) Fläschchen in einer biologischen Sicherheitswerkbank belüften, um den Druck im Fläschchen dem Atmosphärendruck anzugleichen.
- c) Fläschchen umdrehen, um den Inhalt zu mischen.
- d) Aliquot (ca. 0,1 mL) aus dem Fläschchen zur Anfertigung von Färbungen entnehmen (Färbung für Säurefestigkeit und Gram-Färbung).
- e) Ausstrich und Präparate untersuchen. Vorläufige Ergebnisse erst nach Auswertung der Säurefestigkeit mitteilen.

**Bei Vorliegen von Säurefestigkeit** eine Subkultur auf festem Medium anlegen und Ergebnis berichten als: Geräte-positiv, Säurefestigkeit positiv, ID anstehend.

**Liegen Mikroorganismen vor, die nicht säurefest sind**, Ergebnis berichten als: Geräte-positiv, Säurefestigkeit negativ, Kontaminiert.

**Liegen keine Mikroorganismen auf den Ausstrichen vor**, Fläschchen als zur Zeit negatives Fläschchen wieder in das Gerät einsetzen und Abschluß des Testprotokolls abwarten. Keine mittelbaren Ergebnisse.

Mit Flüssigkeit aus dem BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen können Subkulturen zur Identifizierung angelegt und Empfindlichkeitstests vorgenommen werden.

**Subkultivierung und Rückgabe des Fläschchens:** Das Anlegen von Subkulturen muß in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt werden, und Schutzkleidung, einschließlich Handschuhen und Gesichtsmaske, sollte getragen werden. Die Fläschchen vor der Subkultivierung aufrecht stellen und das Septum dabei mit einem Alkoholtopfer abdecken. Um Überdruck im Fläschchen abzulassen, der sich als Folge des Wachstums der kontaminierenden Mikroorganismen bilden kann, Alkoholtopfer und Septum mit einer sterilen Nadel der Stärke 25 (oder dünner) mit einem passenden Filter oder kleiner Kompressen durchstechen. Nach Entweichen des Überdrucks und vor der Probenentnahme für Subkulturen sollte die Nadel entfernt werden. Das Einstechen und Zurückziehen der Nadel sollte mit einer geradlinigen Bewegung ohne Drehungen ausgeführt werden, da diese das Septum permanent schädigen können. Zur Anlegung einer Subkultur das belüftete Fläschchen umdrehen, um den Inhalt zu mischen und eine neue Spritze mit einer Nadel der Stärke 25 einstechen, um Kulturmedium zur weiteren Verarbeitung zu entnehmen. **Die Nadel nicht wieder mit der Kappe versehen. Nadeln und Spritzen in einen punktionssicheren Behälter für gefährliche Bioabfälle werfen.**

Falls gewünscht, kann der Anwender ein Fläschchen mit negativem Ausstrich zur weiteren Überwachung bis zum Abschluß des Testprotokolls wieder in das Gerät einsetzen.

Nach Ablauf der sechswöchigen Inkubationsdauer wird eine visuelle Überprüfung aller im Gerät negativen Fläschchen vorgenommen. Falls ein Fläschchen visuell positiv erscheint (d.h. trüb, möglicherweise mit Klumpen von Mykobakterien), sollte eine Subkultur angelegt und eine Färbung auf säurefeste Bakterien gemacht werden, und bei einem positiven Ergebnis der Färbung ist das Fläschchen als vermutlich positiv zu behandeln. Zeigt das Fläschchen keine Anzeichen von Positivität, ist es vor der Entsorgung zu sterilisieren.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollzertifikate sind jedem Karton mit Medien beigelegt.

Es wird empfohlen, jede neue Sendung oder Charge des **BACTEC** MYCO/F-Sputa-Kulturmediums mit den in der nachstehenden Tabelle aufgeführten **ATCC**-Kontrollorganismen als positive Kontrolle und mit einem nichtinkulierten Fläschchen als negative Kontrolle zu testen.

Organismus	Bereich der Nachweiszeit (Tage)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 bis 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 bis 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 bis 12

Vorbereitung des positiven Kontrollfläschchens:

1. Organismus in 7H9-Bouillon anzüchten.
2. Mit Hilfe von steriler NaCl-Lösung wird eine Suspension des Organismus auf McFarland-Standard Nr. 1 ( $\approx 10^7$  KBE/mL) eingestellt.
3. Die Suspension wird mit steriler NaCl-Lösung auf  $10^4$  KBE/mL verdünnt.
4. 1 mL dieser Suspension wird in ein MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen inokuliert, das mit 2,0 mL rekonstituierter **BACTEC PANTA/F**-Lösung angereichert wurde. **Ein Inokulum von 1,0 mL wird nur bei den Qualitätskontrollorganismen verwendet.**

Die Fläschchen mit den positiven und negativen Kontrollen sollen in das Gerät eingelesen und getestet werden. Das positive Kontrollfläschchen muß als Geräte-positiv innerhalb des in der vorstehenden Tabelle angegebenen Bereichs nachgewiesen werden. Die negative Kontrolle muß negativ bleiben. Gibt eines dieser Fläschchen nicht die erwarteten Ergebnisse, benachrichtigen Sie bitte vor Verwendung der Medien unseren Technischen Kundendienst.

Informationen zur Qualitätskontrolle des **BACTEC** 9000MB-System entnehmen Sie bitte der Bedienungsanleitung für das **BACTEC** 9000MB-System (MA-0092).

## ERGEBNISSE

Eine Wachstums-positive Probe wird vom **BACTEC** 9000MB-System bestimmt und durch einen Ausstrich auf säurefeste Bakterien bestätigt. Ein positives Ergebnis weist auf die vermutliche Anwesenheit von lebensfähigen Mikroorganismen im Fläschchen hin.

## VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

### Kontamination

Die externe Kontamination der Proben während der Entnahme, Digestion, Dekontamination und Inokulation in die **BACTEC**-Fläschchen muß sorgfältig vermieden werden. Aufgrund der Nahrhaftigkeit des Mediums und der nicht-selektiven Natur des Fluoreszenznachweises des Sauerstoffverbrauchs kann es zu einer Durchbruchskontamination kommen. Außerdem muß bei der Digestion und Dekontamination vorsichtig vorgegangen werden, um eine Durchbruchskontamination von nicht mykobakteriellen Organismen zu vermeiden. Es dürfen nur die angegebenen Probentypen getestet werden. Eine kontaminierte Probe ergibt einen positiven Wert ohne klinische Relevanz. Eine entsprechende Beurteilung muß vom Anwender auf der Basis von Faktoren wie z.B. Ergebnis des Ausstrichs auf säurefeste Bakterien, Art des isolierten Organismus, Vorkommen desselben Organismus in mehreren Kulturen, Patientenanamnese usw. vorgenommen werden. (Siehe Bedienungsanleitung für das **BACTEC** 9000MB-System, MA-0092, für Verfahren zur erneuten Dekontamination von Fläschchen.)

Es wird die Dekontamination mit Hilfe der N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid-(NALC-NaOH)-Methode empfohlen. Andere Dekontaminationsmethoden sind im Zusammenhang mit **BACTEC** MYCO/F-Sputa-Medien nicht untersucht worden. Derartige zur Digestion und Dekontamination verwendete Substanzen haben möglicherweise schädliche Wirkungen auf Mykobakterien.

### Probentyp

Gegebenenfalls mit **BACTEC** Supplement/F und **BACTEC PANTA/F** angereicherte MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen sind zur Kultivierung und Isolierung von digenierten, dekontaminierten, klinischen Proben sowie anderen sterilen Körperflüssigkeiten als Blut vorgesehen. Die untere Nachweisgrenze dieses Tests kann je nach Art der vorliegenden Mykobakterien-Spezies variieren.

Kulturfläschchen mit MYCO/F-Sputa-Medium **NICHT** zur Isolierung von Mykobakterien aus Blut **VERWENDEN**.

Pleuraflüssigkeiten können rote und weiße Blutkörperchen<sup>10</sup> enthalten, die eine hohe oxidative Stoffwechselrate aufweisen und daher falsche positive Ergebnisse liefern können.

### Allgemeine Erwägungen

Der Nachweis mykobakterieller Spezies in klinischen Proben ist abhängig von der Zahl der in der Probe vorliegenden Organismen, der Methode der Probenentnahme, von Patientenfaktoren wie z.B. dem Vorliegen von Symptomen, früherer Therapie und der Verarbeitungsmethode. Die Einhaltung der Verfahrensvorschriften ist von entscheidender Bedeutung, um eine optimale Ausbeute der Mykobakterien zu erhalten. Kontamination mit saprophytischen Mykobakterien im Leitungswasser oder anderen Laborreagenzien und -geräten kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

Eine optimale Ausbeute an Isolaten wird durch die Zugabe von 0,5 mL verarbeitetem und resuspendiertem Probeninokulum pro Fläschchen erzielt. Die Intensität des Digestions- und Dekontaminationsprotokolls bei der Verarbeitung der Proben kann die Isolierung und die Zeit bis zum Nachweis ebenfalls beeinflussen.

Mykobakterien können sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm, dem Alter der Kultur und anderen Variablen in bezug auf die Säurefestigkeit unterscheiden. Alle Fläschchen, die vom Gerät als positiv ausgewiesen werden oder nach Ablauf des Testprotokolls trüb erscheinen, müssen sowohl auf selektiven als auch auf nicht-selektiven Mykobakterien-Medien subkultiviert werden. Nicht-mykobakterielle Spezies können eventuell vorliegende Mykobakterien überwachsen. Diese Kulturfläschchen müssen erneut dekontaminiert und angezüchtet werden. (Verfahren zur erneuten Dekontamination von Fläschchen entnehmen Sie bitte der Bedienungsanleitung für das **BACTEC** 9000MB-System, MA-0092).

Koloniemorphologie und Pigmentierungseigenschaften können nur auf festen Medien bestimmt werden. Weitere Identifizierungstests können durchgeführt werden, um die mykobakterielle Spezies eines positiven MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchens zu bestimmen.

**BACTEC** MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen, die positiv erscheinen, können eine oder mehrere Mykobakterien-Spezies und/oder andere nicht-mykobakterielle Spezies enthalten. Die Identifizierung der vorliegenden Mykobakterien erfordert die Anlage einer Subkultur auf einem festem Medium und zusätzliche Verfahren zur Identifizierung anderer, eventuell vorliegender Organismen. Die Beständigkeit der mikroskopischen Morphologie im **BACTEC** MYCO/F-Sputa-Medium wurde noch nicht festgelegt.

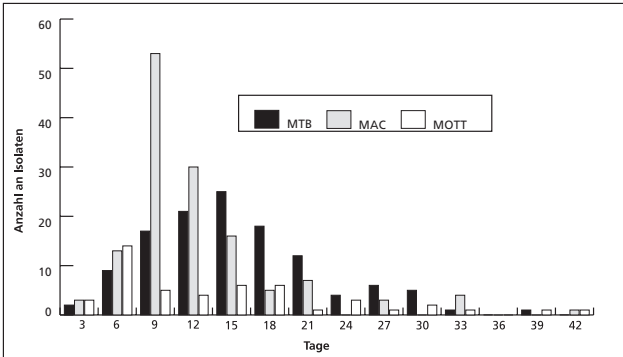
**BACTEC** MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen werden bei 37 °C inkubiert, so daß die Isolierung von Mykobakterien, die andere Inkubationstemperaturen erfordern, möglicherweise verhindert wird (z.B. *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Die Isolierung derartiger Organismen erfordert zusätzliche Kulturverfahren. Organismen mit besonderen Wachstumsanforderungen (z.B. *M. haemophilum*) werden möglicherweise mit Hilfe des **BACTEC** MYCO/F-Sputa-Mediums nach Inkubation bei der entsprechenden Temperatur nicht isoliert. Bei internen bzw. klinischen Untersuchungen wurden die folgenden Isolate vom **BACTEC** 9000MB-System unter Verwendung der **BACTEC** MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen als positiv bestimmt: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium xenopi*.

Die Verwendung von **BACTEC PANTA/F**-Antibiotika-Supplement, die bei allen nichtsterilen Proben erforderlich ist, kann eine hemmende Wirkung auf bestimmte Mykobakterien ausüben.

Abschließende Subkulturen wurden im Rahmen der klinischen Untersuchungen nicht routinemäßig durchgeführt. Eine tatsächliche Häufigkeit falsch-negativer Ergebnisse, definiert als ein MYCO/F-Sputa-Kulturfläschchen, das während der sechswöchigen Inkubationsdauer negativ blieb, subkultiviert wurde und einen mykobakteriellen Organismus ergab, kann zur Zeit nicht bestimmt werden.

## ZU ERWARTENDE WERTE

Die Häufigkeitsverteilung der Isolationszeiten bei im BACTEC 9000MB-System positiven Proben aus klinischen Untersuchungen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



## LEISTUNGSMERKMALE

### Proben aus dem Respirationstrakt

Das BACTEC 9000MB-System wurde an vier klinischen Untersuchungsstellen ausgewertet, darunter Laboratorien des öffentlichen Gesundheitsdienstes sowie große Krankenhäuser mit Intensivpflegestationen in geographisch unterschiedlichen Gebieten. Die Studienkohorten umfaßten Patienten mit HIV-Infektion, immungeschwächte Patienten und Transplantationspatienten. Das BACTEC 9000MB-System wurde mit dem radiometrischen BACTEC 460TB-System sowie mit herkömmlichen festen Wachstumsmedien zur Isolierung und zum Nachweis von Mykobakterien aus Proben des Respirationstrakts verglichen. Insgesamt 3135 Proben aus dem Respirationstrakt wurden im Rahmen der Studien getestet. Die Gesamtzahl der in der Studie isolierten, für pathogene Mykobakterien positiven Isolate betrug 348. Von diesen positiven Proben wurden 292 (84 %) mit Hilfe des BACTEC 9000MB-Systems isoliert, 260 (75 %) mit dem radiometrischen BACTEC 460TB-System, und 178 (51 %) wurden auf Festmedium (Löwenstein-Jensen) isoliert. Das BACTEC 9000MB-System in Verbindung mit Festmedien konnte 89,6 % aller pathogenen Isolate wiederfinden. Bei nicht-pathogenen MOTT\* (nichttuberkulöse Mykobakterien) betrug die Gesamtzahl der in der Studie isolierten positiven Isolate 40. Von diesen positiven Proben wurden 16 (40 %) mit Hilfe des BACTEC 9000MB-Systems isoliert, 24 (60 %) mit dem radiometrischen BACTEC 460TB-System, und 5 (13 %) wurden auf Festmedien isoliert. Das BACTEC 9000MB-System in Verbindung mit Festmedien konnte 50 % aller nicht-pathogenen MOTT wiederfinden.

\*Zu den nichttuberkulösen (Mykobakterien gehörten) *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. terrae*.

Das BACTEC 9000MB-System war nicht in der Lage, 1,8 % der pathogenen Isolate zu isolieren, die in einem oder mehreren Referenzsystemen (BACTEC 460TB oder herkömmliche Festmedien) isoliert wurden. Dieser prozentuale Anteil stellt zwar einen möglichen Wiederfindungsverlust dar, ist jedoch kein Anzeichen einer tatsächlichen falsch-negativen Bestimmung (Siehe Abschnitt "Verfahrensbeschränkungen"). Wie empfohlen, erhöht die Verwendung eines zweiten Mediums die Wahrscheinlichkeit der Isolierung von mykobakteriellen Organismen. Das BACTEC 9000MB-System zeigte eine Häufigkeit falsch-positiver Ergebnisse von 1,5 % (Geräte-positiv, Ausstrich und/oder Subkultur negativ). Die Gesamtdurchbruchskontamination für das BACTEC 9000MB-System betrug 6,5 %.

### ÜBERSICHT ÜBER DIE WIEDERFINDUNG VON ISOLATEN MIT HILFE DES BACTEC 9000MB-SYSTEMS IM RAHMEN KLINISCHER UNTERSUCHUNGEN

Isoliertes Spezies	Gesamtisolate	9000MB GESAMT	NUR 9000MB	460TB GESAMT	NUR 460TB	LJ GESAMT	NUR LJ
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
<i>M. avium-Komplex</i>	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. gordonae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
andere <i>M.</i> -Spezies	5	5	2	1	0	3	0
ALLE ISOLATE	388	308	76	284	56	183	15

### Nicht aus dem Respirationstrakt stammende Proben:

In einer getrennten Studie an einem großen Universitätskrankenhaus wurden 803 nicht aus dem Respirationstrakt stammende Proben mit BACTEC MYCO/F-Sputa-Kulturmedium, BACTEC 12B-Kulturmedium und einem konventionellen Medium (Löwenstein-Jensen) getestet. Insgesamt wurden in der Studie 38 Isolate isoliert, die positive Ergebnisse für pathogene Mykobakterien aufwiesen. Von diesen positiven Isolaten wurden 29 (76,3 %) mit dem BACTEC 9000MB-System, 30 (78,9 %) im BACTEC 460TB-System und 24 (63,2 %) mit konventionellem Medium (Löwenstein-Jensen) isoliert. Das BACTEC 9000MB-System isolierte zusammen mit Festmedien 89,5 % aller pathogenen Isolate. Die Gesamtanzahl von positiven Proben (pathogene und nichtpathogene Mykobakterien) stammten von: Magen (5,1 %), anderen sterilen Körperflüssigkeiten als Blut (17,9 %), Blut (10,3 %), oberflächlichen Haut-/Wundendränagen (5,1 %), Gewebe (53,8 %) und Harn (7,7 %). Die folgenden Isolate wurden während dieser klinischen Studie im BACTEC 9000MB-System unter Verwendung von MYCO/F-Sputa als positiv festgestellt: *M. tuberculosis*, *M. avium complex*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* und *M. bovis*. Die Gesamtrate falscher Positive (Instrumentenpositiv, Ausstrich und/oder Subkultur negativ) war 5,0 %. Aufgrund der verschiedenen Arten der gesammelten und getesteten Proben wich die falschpositive Rate deutlich von der früher für Proben aus dem Respirationstrakt berichteten Rate ab. Die Durchbruchskontaminationsrate für normalerweise sterile Proben (d.h. Gewebe und andere sterile Körperflüssigkeiten als Blut) betrug von 4,7 % – 18,9 %, die für nichtsterile Proben (d.h. Magen-, Stuhl- und Harnproben sowie oberflächliche Haut-/Wundendränage) betrug von 8,2 % – 73,9 %. Die Durchbruchskontaminationsrate betrug insgesamt 14,9 %.

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung.

# BD Flaconi di coltura BACTEC MYCO/F-Sputa Brodo Middlebrook 7H9 arricchito

Italiano

## USO PREVISTO

Il terreno di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa** (brodo Middlebrook 7H9 modificato, con CO<sub>2</sub>) con l'aggiunta del Supplemento/F **BACTEC** e della miscela di antibiotici **BACTEC PANTA/F**, quando necessario, viene usato con lo strumento della serie fluorescente **BACTEC 9000MB** come procedura qualitativa per la coltura *in vitro* e l'isolamento dei micobatteri. Campioni clinici digeriti e decontaminati e fluidi biologici sterili diversi dal sangue sono campioni accettabili per l'uso.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

A partire dalla metà degli anni 80 e in seguito al diffondersi dell'epidemia dell'AIDS, si è assistito a una nuova insorgenza del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e dei micobatteri diversi da tubercolosi (MOTT), specialmente il complesso *Mycobacterium avium* (MAC). Tra il 1985 e il 1992 il numero dei casi di MTB accertati è aumentato del 18%. Si ritiene che, a livello mondiale, a tutt'oggi la tubercolosi uccida circa 3 milioni di persone all'anno, statistica che pone questa malattia infettiva al primo posto tra le cause di morte.<sup>1</sup> Tra il 1981 e il 1987, gli studi sui casi di AIDS indicavano che il 5,5% dei pazienti affetti da AIDS avevano contratto infezioni micobatteriche non tubercolari, come il MAC. Col 1990, i casi accertati di infezione micobatterica non tubercolare erano aumentati fino ad avere un'incidenza complessiva del 7,6%.<sup>2</sup> Oltre alla recrudescenza dell'MTB, una crescente preoccupazione è stata destata dai ceppi di MTB resistenti agli antibiotici (MDR-TB). La mancanza di tempestività, da parte dei laboratori, nel coltivare, identificare ed attestare i casi di MDR-TB incontrati, ha contribuito, almeno in parte, alla diffusione di questa malattia.

Gli U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) hanno esteso ai laboratori la raccomandazione di compiere ogni sforzo affinché vengano utilizzati dei metodi di analisi più rapidi possibile nella diagnosi dei micobatteri. Queste raccomandazioni includono, fra l'altro, l'utilizzo di un terreno solido e di uno liquido, per la coltura dei micobatteri.<sup>3</sup>

Il sistema **BACTEC 9000MB** è stato creato appositamente per il rilevamento rapido dei micobatteri nei campioni clinici diversi dal sangue. Il sistema comprende un terreno di coltura liquido (flacone di coltura MYCO/F-Sputa), un supplemento di crescita (Supplemento/F) e un supplemento antibiotico (**BACTEC PANTA/F**). Il Supplemento/F **BACTEC** contiene degli stimolatori di crescita per micobatteri ed è usato anche per ricostituire il **BACTEC PANTA/F**. Il **BACTEC PANTA/F** contiene degli agenti antibiotici che hanno lo scopo di sopprimere la crescita di microrganismi della flora contaminante o normale eventualmente sopravvissuti al processo di decontaminazione ed è raccomandato come supplemento per tutti i campioni non sterili. Ogni flacone contiene un sensore capace di rilevare il calo dell'ossigeno sciolto nel terreno, fenomeno dovuto al metabolismo e alla crescita dei microrganismi. Lo strumento tiene sotto controllo l'aumento della fluorescenza del sensore, che è direttamente proporzionale al calo del contenuto di ossigeno sciolto. Valori di lettura positivi indicano la presuntiva presenza di micobatteri vivi nel flacone. L'analisi trattata qui si limita al rilevamento di microrganismi che possono crescere in questo particolare tipo di terreno.

## PRINCIPI DEL PROCEDIMENTO

I campioni clinici diversi dal sangue vengono prelevati e trattati seguendo le procedure standard per il rilevamento dei micobatteri. I campioni trattati vengono poi inoculati mediante ago e siringa in un flacone di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa**, il quale è stato arricchito con il Supplemento/F **BACTEC** e/o **BACTEC PANTA/F**, a seconda del tipo di campione (vedere la sezione **Procedimento**). L'informazione riguardante il paziente viene immessa nel computer del sistema e viene assegnata al flacone una posizione, facendo uso della barra del menu situata sullo strumento. Il flacone viene posto nel sistema **BACTEC 9000MB** e viene incubato in modo continuato a 37 °C e agitato ogni dieci minuti per ottenere un isolamento ottimale. La respirazione da parte dei microrganismi aerobi vivi presenti in un flacone di coltura MYCO/F-Sputa dà luogo a una netta diminuzione dell'ossigeno contenuto nel flacone. L'aumento di fluorescenza del sensore dentro al flacone è causato dal consumo dell'ossigeno disciolto. Ogni flacone viene controllato dal sistema **BACTEC 9000MB** ogni dieci minuti, per quanto riguarda l'aumento di fluorescenza. L'analisi del tasso di ossigeno sciolto permette di determinare se il flacone è positivo in coltura, cioè se il campione sotto test contiene organismi vivi. I flaconi di coltura che rimangono negativi per un minimo di 42 giorni (fino a 56 giorni) e che non mostrano alcun segno visibile di positività, vengono tolti dallo strumento ed eliminati, previa sterilizzazione.

## REAGENTI

Prima di essere impiegati, i flaconi di coltura per espettorati **BACTEC MYCO/F-Sputa** contengono i seguenti reagenti:

### Ingredienti

w/v = peso/volume (weight per volume)

Acqua purificata	40 mL	Solfato di ammonio	0,05% w/v
Brodo base Middlebrook 7H9	0,47% w/v	Citrato ferrico di ammonio	0,006% w/v
Idrolizzato di caseina	0,10% w/v	Polisorbato 80	0,0025% w/v
Supplemento H	0,30% w/v	Emina	0,0005% w/v
Glicerolo	0,10% w/v		

Tutti i terreni di coltura **BACTEC** forniti sono addizionati con CO<sub>2</sub>. La composizione può essere stata modificata per adeguarsi ai requisiti di performance desiderati.

Prima di inoculare i campioni respiratori e quelli non sterili, ad ogni flacone contenente 40 mL di terreno **BACTEC MYCO/F-Sputa** si devono aggiungere 2,0 mL di soluzione del supplemento antibiotico **BACTEC PANTA/F** ricostituito col Supplemento/F **BACTEC**. Prima di inoculare i fluidi biologici sterili diversi dal sangue, ad ogni flacone contenente 40 mL di terreno **BACTEC MYCO/F-Sputa** si devono aggiungere 2,0 mL di Supplemento/F **BACTEC**. Consultare il foglietto illustrativo del **BACTEC PANTA/F** (PP-102) e del Supplemento/F **BACTEC** (PP-103) per ulteriori informazioni.

## PRECAUZIONI

**Precauzioni:** per uso diagnostico *in vitro*.

Questo prodotto contiene gomma naturale allo stato secco.

**CAMPIONI D'ANALISI POTENZIALMENTE INFETTI.** Osservare le precauzioni accetate universalmente<sup>4,5</sup> e le norme interne di laboratorio relative alla manipolazione e all'eliminazione di materiali infetti.

Si raccomandano le pratiche di sicurezza biologica di Livello 2 e l'utilizzo di tutte le apparecchiature specifiche, quando si preparano le colorazioni acido-resistenti e si esegue la coltura dei campioni clinici. Per procedure che comportano la possibilità di propagazione e di manipolazione di *Mycobacterium tuberculosis* o di altri membri della specie *Mycobacterium* messi in coltura, si richiedono le pratiche di sicurezza biologica di Livello 3 e le apparecchiature raccomandate dai CDC.<sup>6</sup>

I flaconi vanno esaminati prima dell'uso, per assicurarsi che non siano contaminati o torbidi, che i tappi non siano rigonfi o incavati, o che non ci siano perdite. In rare occasioni, il collo di vetro del flacone potrebbe essere incrinato, rompendosi al momento di rimuovere il tappo o durante il maneggio. Può anche succedere che il tappo di un flacone non sia sigillato in modo perfetto, come avviene quando il bordo metallico alla base del tappo non si ripiega tutt'intorno in modo uniforme al di sotto del collo del flacone. In entrambi i casi esiste la possibilità che il contenuto del flacone possa gocciolare o fuoriuscire, specialmente se il flacone viene capovolto. **NON USARE** flaconi che presentano segni di contaminazione, danneggiamento o sigillatura imperfetta.

Per ridurre al minimo il rischio di perdite durante l'inoculo del campione nei flaconi di coltura, usare una siringa per tubercolina con ago fisso, calibro 25. Usare una tecnica di inoculo ad una mano ed un supporto per il flacone sicuro, in modo da ridurre il rischio di punture d'ago accidentali. **NON usare aghi di calibro maggiore di 20.** Aghi più grossi usati per l'aggiunta del supplemento, la ventilazione del flacone o la subcoltura, possono danneggiare irrimediabilmente il setto del flacone e causare fuoriuscite.

**Flaconi positivi usati per subcolture, colorazioni, ecc.:** Prima di effettuare il dosaggio, è necessario dar sfogo al gas accumulatosi a causa del metabolismo microbico. I prelievi devono essere eseguiti in una cappa di sicurezza biologica, indossando appropriati indumenti protettivi, mascherare e guanti. Per ulteriori informazioni sulla procedura di subcoltura, vedere la sezione **PROCEDIMENTO**.

Un flacone contaminato può contenere pressione positiva. Se si effettua il prelievo da un flacone contaminato, dei gas e/o il terreno di coltura contaminato possono fuoriuscire dal flacone creando un rischio biologico in forma di aerosol. La contaminazione del flacone può non essere immediatamente visibile.

Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi MYCO/F-Sputa inoculati, prima di eliminarli.

## FLACONI CON PERDITE O ROTTURE

Se un flacone inoculato ha perdite o viene accidentalmente rotto, usare la normale prassi di laboratorio per le fuoriuscite micobatteriche. Come minimo, osservare le precauzioni accettate universalmente. Si raccomanda un tipo di protezione approvato per le vie respiratorie. I flaconi che abbiano fuoriuscite minime, limitate all'area del setto e del tappo, possono essere disinfettati localmente con un disinfettante micobattericida, seguito da una soluzione di alcool isopropilico al 70%. Se il contenuto di un flacone dovesse fuoriuscire nello strumento, si verifica il rischio potenziale di esposizione ad aerosol. Spegnerlo lo strumento e chiudere le porte immediatamente. Sgombrare la zona contaminata. Contattare il responsabile (o responsabili) per la sicurezza o il controllo delle infezioni. Determinare la necessità di spegnere o modificare le impostazioni delle unità per la gestione dell'aria che servono la zona contaminata. Non ritornare nella zona fino a quando tutti gli eventuali aerosol non si siano depositati o siano stati eliminati da un'adeguata ventilazione. Notificare BD contattando, o contattare il rappresentante locale. Il CDC ha pubblicato linee guida da seguire in caso di contaminazione micobatterica accidentale dovuta alla rottura delle provette di coltura o delle sospensioni di brodo.<sup>6</sup>

## ISTRUZIONI PER LA CONSERVAZIONE

**FLACONI DI CULTURA PER ESPETTORATI MYCO/F-SPUTA:** Conservare a 2° – 25 °C, in luogo asciutto e al riparo da luce diretta.

**NON** usare oltre la data di scadenza.

**SUPPLEMENTO ANTIBIOTICO BACTEC PANTA/F:** Conservare il **BACTEC PANTA/F** non ricostituito a 2 – 8 °C. Una volta ricostituito, esso deve venir usato immediatamente o congelato tra -20 e -70 °C fino a sei mesi. **NON** scongelare e ricongelare. Proteggere dalla luce. Evitare il surriscaldamento.

**NON** usare oltre la data di scadenza.

## TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

L'aspettatore o altri campioni delle vie respiratorie devono essere digeriti, decontaminati e concentrati prima dell'inoculo nei flaconi di coltura per espettorati MYCO/F-Sputa. Si raccomanda il metodo che utilizza N-acetil-L-cisteina-idrossido di sodio.<sup>6,7,8</sup> Come alternativa, si può usare il kit **BBL MycoPrep** per il trattamento dei campioni. Non sono stati provati altri metodi di decontaminazione con il terreno per espettorati MYCO/F-Sputa. Dopo la centrifugazione (≥ 3000 x g, 15 min) il sedimento deve essere risospeso in un tampone fosfato sterile, pH 6,8.

È necessario preparare i campioni non respiratori diversi dal sangue attenendosi al Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> al Manuale CDC, o alle regole specificate nel manuale del vostro laboratorio individuale.

## PROCEDIMENTO

**Il terreno per espettorati MYCO/F-Sputa deve essere usato con uno strumento BACTEC 9000MB della serie fluorescente.**

**Materiali forniti:** Flaconi di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa**, Supplemento antibiotico **BACTEC PANTA/F** e Supplemento per terreni **BACTEC Supplemento/F**.

**Materiali richiesti ma non forniti:** Centrifuga, cella di sicurezza biologica, autoclave, incubatore sotto CO<sub>2</sub> a 37 °C, provette per centrifuga **Falcon** da 50 mL, 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, pipette da trasferimento sterili, siringa per tuberculina sterile con ago di calibro 25, disinfettante micobattericida, alcool isopropilico al 70%, agar micobatterico o terreno a base d'uovo, brodo 7H9, soluzione fisiologica sterile, organismi per il controllo di qualità (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841 e *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478), microscopio e materiali per la colorazione dei vetrini.

## INOCULO DEI FLACONI DI CULTURA PER ESPETTORATI MYCO/F-SPUTA

1. Togliere il tappo dal flacone **BACTEC** e assicurarsi che il flacone non sia incrinato, contaminato o troppo torbido. Controllare anche che il setto non sia rigonfio o incavato. **NON USARE** il flacone se viene notato qualsiasi difetto.
2. Contrassegnare il flacone di coltura col numero d'identificazione del campione.
3. Ricostituire il flacone **BACTEC PANTA/F** ioflittizzato con 10 mL di **BACTEC Supplemento/F** usando una siringa con puntale **Luer-Lok** munito di ago calibro 25. **NON USARE** aghi di calibro maggiore di 20. Aghi più grossi possono danneggiare irrimediabilmente il setto del flacone. Mescolare bene il contenuto. Ispezionare ad occhio nudo il contenuto del flacone per verificare che il supplemento antibiotico **BACTEC PANTA/F** si sia sciolto completamente.
4. Per i campioni delle vie respiratorie e quelli non sterili, i flaconi di terreno per espettorati MYCO/F-Sputa da inoculare devono essere arricchiti con 2,0 mL della soluzione **BACTEC PANTA/F** ricostituita. I flaconi così arricchiti devono essere inoculati entro due ore dall'aggiunta della soluzione **BACTEC PANTA/F**. Prima dell'inoculo con la soluzione **BACTEC PANTA/F**, pulire il setto con alcool isopropilico al 70%. Si raccomanda una siringa per tuberculina con ago fisso di calibro 25. Usare una tecnica di inoculo ad una mano e un sicuro supporto per il flacone, in modo da ridurre il rischio di punture d'ago accidentali. Per i tessuti o gli altri campioni solidi si raccomanda di usare un ago più largo (calibro 20 – 22) e una siringa con puntale **Luer-Lok** o simile.  
Per i fluidi biologici sterili diversi dal sangue (es. il liquido sinoviale e quello peritoneale), è necessario aggiungere 2,0 mL di Supplemento/F **BACTEC** ai flaconi di terreno **BACTEC MYCO/F-Sputa** prima dell'inoculo. Prima di inoculare con il Supplemento/F **BACTEC**, pulire il setto con alcool isopropilico al 70%. Si raccomanda l'uso di una siringa per tuberculina provvista di ago fisso, calibro 25. Usare una tecnica di inoculo ad una mano ed un supporto sicuro per il flacone, in modo da ridurre il rischio di punture d'ago accidentali.
5. Iniettare in modo sterile 0,5 mL di campione trattato per flacone, usando una siringa per tuberculina con ago fisso di calibro 25. L'inserimento ed il ritiro dell'ago devono essere eseguiti con un movimento lineare, senza alcuna torsione che potrebbe danneggiare permanentemente il setto. Pulire il setto con un disinfettante micobattericida, seguito da alcool isopropilico al 70%. I flaconi inoculati devono essere collocati nel sistema **BACTEC 9000MB** appena possibile, e comunque lo stesso giorno in cui il campione viene decontaminato, trattato e inoculato nei flaconi di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa**.  
A questo punto, devono essere inoculati anche terreni tradizionali come il Lowenstein-Jensen o il 7H10/7H11.
6. I flaconi inseriti nello strumento saranno analizzati automaticamente per l'intera durata del protocollo del test. Il sistema **BACTEC 9000MB** determinerà i flaconi positivi e li identificherà (vedere il manuale d'uso del sistema **BACTEC 9000MB**, MA-0092). Il sensore dentro il flacone può non apparire visibilmente diverso nei flaconi positivi o negativi, ma il sistema **BACTEC 9000MB** potrà determinare un'eventuale differenza nella fluorescenza del sensore.
7. I flaconi positivi vanno subcolturali e si deve preparare un vetrino acido-resistente.

Trattamento di un flacone identificato come positivo dallo strumento:

- a) Togliere il flacone dallo strumento.
- b) In una cella di sicurezza biologica, ventilare il flacone per portare il suo contenuto alla pressione atmosferica.
- c) Invertire il flacone per mescolarne il contenuto.
- d) Prelevare un'aliquota dal flacone (0,1 mL ca.) per preparare le colorazioni (AFB e di Gram).
- e) Ispezionare il vetrino e le colorazioni. Stendere un referto preliminare solo dopo aver compiuto una valutazione della colorazione acido-resistente.

**Se l'AFB è positivo**, eseguire una subcoltura su terreno solido e refertare come: positivo per lo strumento, positivo per AFB, identificazione in corso.

**Se sono presenti dei microrganismi diversi dai bacilli acido-resistenti**, refertare come: positivo per lo strumento, negativo per AFB, contaminato.

**Se non è presente alcun microrganismo sul vetrino**, rimettere il flacone nello strumento come flacone negativo e lasciar ultimare il periodo d'analisi. Non viene steso alcun referto. Le subcolture per l'identificazione e le prove di sensibilità ai farmaci possono essere effettuate utilizzando il liquido contenuto nei flaconi di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa**.

**Subcultura e rientro del flacone:** La subcultura deve essere eseguita in una camera di sicurezza biologica, indossando appropriati indumenti protettivi, maschere e guanti compresi. Prima di effettuare la subcultura, porre i flaconi in posizione verticale e collocare un tampone imbevuto d'alcool sul setto. Per liberare l'eventuale pressione positiva nel flacone, causata dalla crescita di contaminanti, inserire un ago di calibro 25 (o più piccolo), munito di un appropriato filtro o compressa, attraverso il tampone d'alcool e il setto. L'ago va rimosso non appena la pressione diminuisce e prima di effettuare il prelievo del flacone per subcultura. L'inserimento e la rimozione dell'ago devono essere eseguiti con un movimento lineare, senza alcuna torsione che potrebbe danneggiare permanentemente il setto. Per subculturare il flacone ventilato, capovolgere bene il contenuto, poi inserire una nuova siringa con un ago da 25 e prelevare del terreno di coltura per ulteriori prove. **Non ritappare l'ago. Eliminare aghi e siringhe in un contenitore per rifiuti a rischio biologico, adatto per oggetti appuntiti.**

Se si desidera, si può rimettere nello strumento un flacone che abbia dato uno striscio negativo, e tenerlo sotto controllo fino al termine del procedimento d'analisi.

Al termine delle sei settimane d'incubazione, esaminare ad occhio nudo tutti i flaconi riconosciuti come negativi dallo strumento. Se il flacone appare visibilmente positivo (cioè torbido, con possibili grumi di micobatteri) si devono eseguire una subcultura, una colorazione acido-resistente e, qualora il risultato della colorazione acido-resistente sia positivo, lo si deve trattare come presumibilmente positivo. Se il flacone non mostra alcun segno di positività, esso va sterilizzato, quindi eliminato.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Certificati di controllo qualità vengono forniti con ciascuna confezione di terreno.

Si raccomanda che ogni nuova confezione o nuovo lotto di terreno di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa** ricevatò venga testato con gli organismi ATCC di controllo elencati qui sotto, qualificati come controllo positivo, e con un flacone non inoculato, come controllo negativo.

Organismo	Margine di tempo per il rilevamento (giorni)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 a 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 a 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 a 12

Per preparare il flacone del controllo positivo:

1. Coltivare l'organismo in brodo 7H9.
2. Preparare una sospensione dell'organismo al McFarland N° 1 ( $\approx 10^7$  UFC/mL), utilizzando soluzione fisiologica sterile.
3. Diluire la sospensione al  $10^4$  UFC/mL, per mezzo di soluzione fisiologica sterile.
4. Inoculare 1 mL della sospensione ottenuta in un flacone di coltura MYCO/F-Sputa, il quale è stato arricchito con 2,0 mL di **BACTEC PANTA/F** ricostituito.  
**Solamente gli organismi di controllo qualità hanno un volume d'inoculo di 1 mL.**

Il flacone del controllo positivo e quello negativo devono essere fatti passare dentro allo strumento e testati. Il flacone del controllo positivo deve venir identificato come positivo dallo strumento, con valori compresi nella gamma presentata alla tabella sopra. Il controllo negativo deve rimanere invariato. Se uno di questi flaconi non dà i risultati attesi, non si devono usare i terreni finché non si sia contattato il rappresentante locale di BD, al numero riportato alla fine di questo foglietto.

Per informazioni sul controllo qualità del sistema **BACTEC 9000MB**, vedere il manuale d'uso del sistema **BACTEC 9000MB (MA-0092)**.

## RISULTATI

La positività in coltura di un campione viene determinata dal sistema **BACTEC 9000MB** e confermata da un vetrino acido-resistente. Un risultato positivo indica la presuntiva presenza di microrganismi vivi nel flacone.

## LIMITI DEL PROCEDIMENTO

### Contaminazione

Fare attenzione a non contaminare il campione in fase di prelievo, digestione, decontaminazione ed inoculo nel flacone **BACTEC**. A causa della ricchezza del terreno e della natura non selettiva del metodo di rilevamento del consumo d'ossigeno tramite fluorescenza, si può verificare della contaminazione. Le procedure di digestione e decontaminazione devono essere effettuate accuratamente, per ridurre la contaminazione da parte di organismi non micobatterici. Usare per il test solamente i tipi di campioni indicati. Un flacone contaminato produrrà una lettura positiva senza significato clinico. Tale determinazione deve essere effettuata dall'analista sulla base di fattori quali: il risultato dello striscio acido-resistente, il tipo di organismo isolato, la presenza dello stesso organismo in diverse colture, la cartella clinica del paziente, ecc. (per il procedimento di ridecontaminazione del flacone, consultare il manuale d'uso del sistema **BACTEC 9000MB, MA-0092**).

Per la decontaminazione, si raccomanda di usare il metodo con la combinazione N-acetil-L-cisteina-idrossido di sodio (NALC-NaOH). Non sono stati testati altri metodi di decontaminazione in combinazione col terreno **BACTEC MYCO/F-Sputa**. I decontaminanti per digestione possono avere degli effetti dannosi sui micobatteri.

### Tipo di campione

I flaconi di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa** con l'aggiunta di Supplemento/F **BACTEC** e di **BACTEC PANTA/F**, quando necessario, vanno usati per la coltura e l'isolamento a partire da campioni clinici digeriti e decontaminati e fluidi biologici sterili diversi dal sangue. Il livello di rilevamento minimo di questo test può variare a seconda della specie di micobatteri presente.

**NON USARE** i flaconi di coltura contenenti il terreno MYCO/F-Sputa per l'isolamento di micobatteri dal sangue.

I liquidi pleurici possono contenere globuli rossi e bianchi<sup>10</sup> con un alto tasso di metabolismo ossidativo che può dare risultati falsi positivi.

### Considerazioni di carattere generale

Il rilevamento delle specie di micobatteri nei campioni clinici dipende dal numero di organismi presenti nel campione, dal metodo di prelievo del campione, da fattori dipendenti dal malato come la presenza di sintomi o la terapia precedente, e dal metodo di trattamento del campione. La conformità alle istruzioni sulla procedura è d'importanza cruciale per il recupero ottimale dei micobatteri. La contaminazione dovuta a micobatteri saprofiti provenienti dall'acqua di rubinetto o ad altri reagenti ed attrezzature di laboratorio, può essere la causa di risultati falsi positivi.

Per ottenere la massima quantità di isolati, aggiungere ad ogni flacone 0,5 mL di inoculo trattato e risospeso. La rigorosità del protocollo di digestione e decontaminazione usato per trattare il campione può inoltre influire sull'isolamento e sul tempo necessario al rilevamento.

La colorazione dei micobatteri acido-resistenti può variare in funzione del ceppo, l'età della coltura e altre variabili. Tutti i flaconi positivi riconosciuti come tali dallo strumento, o di aspetto torbido al termine della procedura d'analisi, devono essere subcolturali in terreni micobatterici sia selettivi che non selettivi. Le specie non micobatteriche possono crescere più in fretta di quelle dei micobatteri presenti. Questi flaconi di coltura devono venir ridecontaminati e rimessi in coltura (consultare il manuale d'uso del sistema **BACTEC 9000MB, MA-0092**, relativamente alla procedura di ridecontaminazione del flacone).

Le caratteristiche di morfologia e pigmentazione delle colonie possono essere determinate solamente su terreni solidi. Si possono eseguire altre analisi di identificazione per determinare le specie di micobatteri in un flacone positivo di terreno per espettorati MYCO/F-Sputa.

I flaconi **BACTEC MYCO/F-Sputa** che appaiono positivi possono contenere una o più specie di micobatteri e/o altre specie che non appartengono ai micobatteri. L'identificazione dei micobatteri presenti richiede la subcultura su terreni solidi e delle analisi supplementari per identificare gli organismi presenti. La coerenza della morfologia microscopica nel **BACTEC MYCO/F-Sputa** non è stata stabilita.



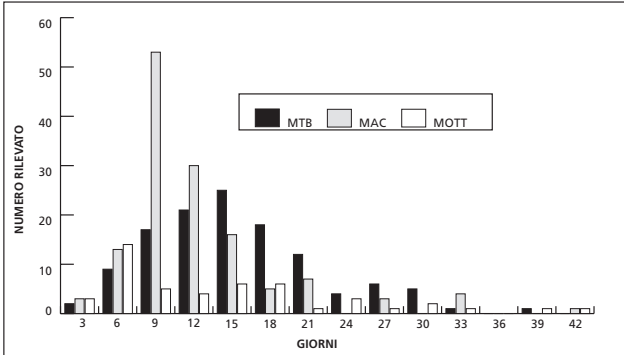
I flaconi **BACTEC MYCO/F-Sputa** vengono incubati a 37 °C, il che esclude di fatto il recupero di micobatteri che necessitano di temperature d'incubazione diverse (es.: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Il recupero di tali organismi richiede metodi di coltura supplementari. Gli organismi con esigenze di crescita specifiche (es. *M. haemophilum*) possono non venir isolati nel **BACTEC MYCO/F-Sputa**, anche quando incubati alla temperatura adeguata. Gli isolati seguenti sono stati rilevati come positivi dal sistema **BACTEC 9000MB** in combinazione con l'utilizzo dei flaconi di coltura per espettorati **BACTEC MYCO/F-Sputa**, sia nel corso di studi interni che di prove cliniche: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium xenopi*.

L'uso del supplemento antibiotico **BACTEC PANTA/F**, sebbene necessario per tutti i campioni non sterili, può avere effetti inibitori su certi micobatteri.

Durante gli studi clinici non sono state eseguite subcolture finali in modo sistematico; perciò il tasso reale dei falsi negativi, definito come il flacone MYCO/F-Sputa che rimane negativo lungo l'intero periodo di incubazione (sei settimane), ma che dopo la subcoltura ha evidenziato la crescita di un organismo micobatterico, non ha potuto essere determinato.

## VALORI PREVISTI

La distribuzione della frequenza dei tempi di recupero per i campioni delle vie respiratorie sottoposti a prove cliniche, determinati come positivi dal sistema **BACTEC 9000MB**, è presentata nell'illustrazione che segue.



## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

### Campioni delle vie respiratorie:

Il sistema **BACTEC 9000MB** è stato valutato in quattro sedi cliniche diverse, comprendenti dei laboratori di igiene pubblica e dei grossi ospedali specializzati in diverse località geografiche. La popolazione delle sedi comprendeva pazienti affetti da AIDS, pazienti con sistema immunitario compromesso e pazienti che avevano subito trapianti. Il sistema **BACTEC 9000MB** è stato messo a confronto con il sistema radiometrico **BACTEC 460TB** e con terreni di coltura solidi convenzionali per il recupero e l'isolamento di micobatteri da campioni delle vie respiratorie. Nel corso delle prove sono stati testati in totale 3135 campioni delle vie respiratorie. Il numero totale degli isolati positivi di micobatteri patogeni recuperati durante questo studio è stato 348. Di questi, 292 (84%) sono stati ottenuti col sistema **BACTEC 9000MB**, 260 (75%) provenivano dall'analisi col sistema radiometrico **BACTEC 460TB** e 178 (51%) provenivano da terreni solidi (Lowenstein-Jensen). Il sistema **BACTEC 9000MB** e i terreni solidi insieme hanno recuperato l'89,6% della totalità degli isolati patogeni. Per quanto riguarda i MOTT\* (Micobatteri diversi da tubercolosi) non patogeni, il numero totale degli isolati positivi recuperati nel corso dello studio è stato 40. Di questi positivi, 16 (40%) sono stati rilevati col sistema **BACTEC 9000MB**, 24 (60%) sono stati recuperati col sistema radiometrico **BACTEC 460TB** e cinque (13%) provenivano da terreni solidi. Il sistema **BACTEC 9000MB** e i terreni solidi, insieme, hanno recuperato il 50% del totale dei MOTT non patogeni.

\* (I MOTT non patogeni comprendevano *M. goodii*, *M. abscessus*, *M. terrae*.)

Il sistema **BACTEC 9000MB** non è riuscito a recuperare l'1,8% degli isolati patogeni che erano stati rilevati da uno o più degli altri sistemi di riferimento (**BACTEC 460TB** o terreni solidi convenzionali). Anche se questa percentuale rappresenta una perdita potenziale di recupero, essa non corrisponde effettivamente a un falso negativo (vedere la sezione «Limiti del procedimento»). L'utilizzo di un secondo terreno, come raccomandato, aumenta la probabilità di recupero dei micobatteri. Il sistema **BACTEC 9000MB** ha dato un tasso di falsi positivi dell'1,5% (identificati come positivi dallo strumento, ma negativi allo striscio e/o alla subcoltura). Il tasso di contaminazione globale per il sistema **BACTEC 9000MB** è stato del 6,5%.

### PROSPETTO RIASSUNTIVO DEL RECUPERO DI ISOLATI DA CAMPIONI RESPIRATORI, OTTENUTO CON L'UTILIZZO DEL SISTEMA BACTEC 9000MB, NEL CORSO DELLE PROVE CLINICHE

Specie isolate	Totale isolati	TOTALE 9000MB	9000MB SOLO	TOTALE 460TB	460TB SOLO	TOTALE LJ	LJ SOLO
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
Complesso <i>M. avium</i>	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. goodii</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. specie (altri)</i>	5	5	2	1	0	3	0
<b>TOTALE ISOLATI</b>	<b>388</b>	<b>308</b>	<b>76</b>	<b>284</b>	<b>56</b>	<b>183</b>	<b>15</b>

### Campioni non delle vie respiratorie:

In uno studio individuale presso una grande clinica universitaria ospedaliera, si sono esaminati 803 campioni non delle vie respiratorie con il terreno di coltura **BACTEC MYCO/F-Sputa**, con il terreno di coltura **BACTEC 12B** e con un terreno convenzionale (Lowenstein-Jensen). Il numero totale di isolati positivi per micobatteri patogeni ottenuti dallo studio è stato 38. Il sistema **BACTEC 9000MB** ha isolato 29 (76,3%) di questi isolati positivi, 30 (78,9%) sono stati isolati con il

sistema **BACTEC** 460TB, e 24 (63,2%) sono stati isolati con il terreno convenzionale (Lowenstein-Jensen). Il sistema **BACTEC** 9000MB combinato con i terreni solidi ha isolato l'89,5% del totale degli isolati patogeni. Il totale dei campioni positivi (micobatteri patogeni e non patogeni) proveniva dalle seguenti fonti: gastrica (5,1%), fluidi biologici sterili diversi dal sangue (17,9%), feci (10,3%), pelle di superficie/drenaggio da ferita (5,1%), tessuto (53,8%) e urine (7,7%). Durante questo saggio clinico, i seguenti isolati sono stati identificati come positivi con il sistema **BACTEC** 9000MB usando MYCO/F-Sputa: *M. tuberculosis*, il complesso *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. bovis*. Il tasso generale di falsi positivi (positivi per lo strumento, negativi per striscio e/o subcoltura) è stato del 5,0%. Il tasso di falsi positivi è differito in modo significativo da quello riportato in passato per i campioni delle vie respiratorie, in conseguenza della varietà di campioni raccolti ed esaminati. Il tasso di contaminazione invasiva per campioni normalmente sterili (ossia tessuto e fluidi biologici sterili diversi dal sangue) è variato dal 4,7% al 18,9%; per i campioni non sterili (ossia drenaggio gastrico, feci, urina, pelle di superficie/drenaggio da ferita) è variato dall'8,2% al 73,9%. In generale il tasso di contaminazione invasiva è stato del 14,9%.

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD.

## **BD Frascos de cultivo BACTEC MYCO/F-Sputa** **Caldo Middlebrook 7H9 suplementado**

Español

### USO PREVISTO

Los medios de cultivo **BACTEC** MYCO/F-Sputa (caldo Middlebrook 7H9 modificado con CO<sub>2</sub>) con **BACTEC** Suplemento/F y mezcla antibiótica **BACTEC** PANTA/F añadidos, cuando sea necesario, se utilizan con el instrumento **BACTEC** 9000MB de la serie fluorescente como un procedimiento cualitativo para el cultivo *in vitro* y recuperación de micobacterias. Las muestras que pueden ser utilizadas son las muestras clínicas descontaminadas y digeridas y los fluidos corporales estériles no sanguíneos.

### RESUMEN Y EXPLICACION

Desde mediados de 1980 con la diseminación de la epidemia del SIDA, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y otras micobacterias además de tuberculosis (MOTT), especialmente el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), han venido resurgiendo. Desde 1985 hasta 1992, el número de casos informados de MTB aumentó en 18%. La tuberculosis continúa siendo la causa de muerte de aproximadamente 3 millones de personas al año en todo el mundo, constituyendo así, la primera causa de muerte entre las enfermedades infecciosas.<sup>1</sup> Entre 1981 y 1987, las encuestas de casos de SIDA indicaron que 5,5% de los pacientes con SIDA tenían infecciones micobacterianas diseminadas de tipo no tuberculoso, como por ejemplo, MAC. En 1990, el aumento de casos de infecciones micobacterianas diseminadas no tuberculosas resultó en una incidencia acumulada de 7,6%.<sup>2</sup> Además de la reaparición de MTB, las cepas de MTB resistentes a múltiples antibióticos (MDR-TB) constituyen una gran preocupación. Retrasos en los análisis de laboratorio para el crecimiento, identificación e informe de casos relacionados a MDR-TB contribuyeron, al menos en parte, a la diseminación de la enfermedad.

Los U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) han recomendado que los laboratorios deben hacer todos los esfuerzos para utilizar los métodos más rápidos disponibles para el diagnóstico y análisis de micobacterias. Estas recomendaciones incluyen el uso de medios líquidos y sólidos para el cultivo micobacteriano.<sup>3</sup>

El sistema **BACTEC** 9000MB está diseñado para la detección rápida de micobacterias en muestras clínicas no sanguíneas. El sistema incluye un medio de cultivo líquido (frasco de cultivo MYCO/F para esputos), un suplemento de crecimiento (Suplemento/F) y un suplemento antibiótico (**BACTEC** PANTA/F). El **BACTEC** Suplemento/F contiene intensificadores de crecimiento para micobacterias, y es utilizado también para reconstituir el **BACTEC** PANTA/F. El **BACTEC** PANTA/F contiene agentes antimicrobianos utilizados para suprimir el crecimiento de microorganismos infecciosos o presentes normalmente en la flora que puedan haber sobrevivido al proceso de descontaminación y se recomienda como un aditivo con todas las muestras no estériles. Cada frasco contiene un indicador que puede detectar descensos en el nivel de oxígeno disuelto en el medio como resultado del metabolismo y crecimiento de microorganismos. El instrumento verifica el aumento de la fluorescencia del indicador, que es proporcional al descenso en el contenido de oxígeno disuelto. Un resultado positivo indica la presencia presunta de micobacterias viables dentro del frasco. La detección se limita a los microorganismos capaces de crecer en el medio de cultivo.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Las muestras clínicas no sanguíneas son colectadas y procesadas según los procedimientos normales para la recuperación de micobacterias. Las muestras procesadas son inoculadas con una jeringa y aguja en el frasco de cultivo **BACTEC** MYCO/F para esputos que ha sido suplementado con **BACTEC** Suplemento/F y/o **BACTEC** PANTA/F, según el tipo de muestra (refiérase a la sección de procedimientos). La información sobre el paciente es registrada en el sistema computarizado, y se le asigna una estación al frasco que contiene la muestra conforme al código del menú del instrumento. El frasco es colocado en el sistema **BACTEC** 9000MB y es incubado continuamente a 37 °C agitando cada 10 minutos para asegurar una recuperación máxima. La respiración de los microorganismos aerobios viables presentes en un frasco suplementado de medio MYCO/F para esputos ocasiona un descenso neto del nivel de oxígeno en ese frasco. La disminución del oxígeno disuelto da lugar a un aumento en la fluorescencia del indicador del frasco que detecta el sistema **BACTEC** 9000MB en la verificación que hace cada diez minutos. El análisis de velocidad de descenso del nivel del oxígeno disuelto permite determinar si el frasco es positivo, o sea, que la muestra analizada contiene organismos viables. Los frascos de cultivo que permanecen negativos por un mínimo de 42 días (hasta 56 días), y que no muestran señales visibles de positividad, son retirados del instrumento y esterilizados antes de desecharse.

### REACTIVOS

Antes de realizar el procedimiento, los frascos de cultivo **BACTEC** MYCO/F-Sputa contienen los siguientes reactivos:

#### Componentes

Agua desmineralizada . . . . .	40 mL	Sulfato de amonio . . . . .	0,05% p/v
Base de caldo Middlebrook 7H9 . . . . .	0,47% p/v	Citrato férrico de amonio . . . . .	0,006% p/v
Hidrolizado de caseína . . . . .	0,10% p/v	Polisorbato 80 . . . . .	0,0025% p/v
Suplemento H . . . . .	0,30% p/v	Hemina . . . . .	0,0005% p/v
Glicerol . . . . .	0,10% p/v		

Todos los medios **BACTEC** se suministran con CO<sub>2</sub> añadido. La composición puede haberse modificado de acuerdo con las necesidades específicas de rendimiento.

Antes de inocular muestras del aparato respiratorio y muestras no estériles, es necesario añadir 2,0 mL de la solución del suplemento antibiótico **BACTEC** PANTA/F, reconstituida con **BACTEC** Suplemento/F, a cada frasco de 40 mL de medio **BACTEC** MYCO/F para esputos. Antes de inocular fluidos corporales estériles no sanguíneos, cada frasco de 40 mL de medio **BACTEC** MYCO/F para esputos debe ser suplementado con 2,0 mL de **BACTEC** Suplemento/F. Por favor, consulte los prospectos de **BACTEC** PANTA/F (PP-102) y **BACTEC** Suplemento/F (PP-103) para más información.

### ADVERTENCIAS

**Precauciones:** Para uso diagnóstico *in vitro*.

Este producto contiene goma natural seca.

**PRUEBA PARA MUESTRAS POTENCIALMENTE INFECCIOSAS.** Deben seguirse las precauciones universales<sup>4,5</sup> y normas institucionales en el manejo y desecho de cualquier material contaminado.

Son recomendados los niveles de bioseguridad tipo 2, laboratorios y equipos de prevención, para la preparación de tinción ácido-resistente y para el cultivo de muestras clínicas. Para actividades que involucren la propagación y manipulación de *Mycobacterium tuberculosis* o especies micobacterianas en cultivo, se requieren prácticas de bioseguridad nivel 3, laboratorios y equipo de prevención conforme a las recomendaciones del CDC.<sup>6</sup>

Se debe examinar cada frasco antes de usarlo para ver si se presentan indicios de contaminación, por ejemplo, turbidez, membrana de goma hinchada o hundida, o fugas. En raras ocasiones, el cuello del frasco de vidrio puede estar rajado y puede romperse al quitar el tapón a presión o durante su manipulación. También, es posible que un frasco presente un sellado incompleto del tapón, como por ejemplo, cuando el borde de metal en la superficie inferior del tapón no está uniformemente extendido debajo del final del cuello del frasco. En ambos casos, el contenido de los frascos puede gotear o derramarse, especialmente si se invierte el frasco. **NO SE DEBE USAR** ningún frasco que presente indicios de contaminación, daño o sellado incompleto.

Para reducir a un mínimo la posibilidad de pérdidas durante la inoculación de las muestras en los frascos de cultivo, use jeringas de tuberculina con aguja fija de calibre 25. Se debe utilizar la técnica de inoculación con una sola mano y un soporte adecuado para el frasco para evitar el riesgo de pincharse accidentalmente con la aguja. **NO deben utilizarse agujas que tengan un calibre mayor de 20.** El uso de agujas más grandes durante la adición del suplemento, liberación de la presión o preparación de subcultivos puede dañar permanentemente la membrana de goma del frasco y causar fugas.

**Frascos de cultivo positivos para subcultivos o para teñir, etc.:** Antes de tomar una muestra, es necesario liberar el gas que frecuentemente se acumula debido al metabolismo de los microorganismos. De ser posible, la toma de muestras debe efectuarse en una cámara de seguridad biológica. El operario debe llevar puesta ropa de protección, incluyendo guantes y mascarilla. Vea la sección titulada **PROCEDIMIENTO** para obtener más información sobre subcultivos.

Un frasco contaminado puede contener presión positiva. Si se analiza un frasco contaminado, gas y/o medio de cultivo contaminado puede escaparse del frasco, creando un aerosol peligroso. Es posible que la contaminación del frasco no se vea fácilmente.

Todos los frascos inoculados con MYCO/F para esputos deben esterilizarse en el autoclave antes de desecharse.

#### FRASCOS ROTOS O MAL SELLADOS

Si se observa que un frasco inoculado pierde líquido o si se rompiera accidentalmente, siga el procedimiento establecido en su laboratorio para el manejo de derrames de micobacterias. Como mínimo, se deberán seguir las precauciones universales. Se recomienda el uso de alguna forma aprobada de protección respiratoria. Cualquier frasco que tuviera pérdidas mínimas limitadas a la membrana de goma o al tapón del frasco puede desinfectarse localmente con un desinfectante micobactericida, seguido de alcohol isopropílico al 70%. Si esto ocurriera dentro del instrumento, existe un riesgo potencial de exposición al aerosol. Apague el instrumento y cierre las puertas inmediatamente. Desaloje el área afectada. Póngase en contacto con el(los) Oficial(es) de Seguridad o de Control de Infecciones de su departamento. Determine la necesidad de apagar o modificar el ajuste de las unidades de control de aire de la zona afectada. No vuelva a esa zona hasta que todos los posibles aerosoles se hayan asentado o hayan sido eliminados mediante la ventilación adecuada. Deberá notificarse a BD Diagnostics contactando al su representante local. Los CDC han publicado una guía para el manejo adecuado de contaminaciones por micobacterias debidas a la rotura de frascos de cultivo o suspensiones de caldo de cultivo.<sup>6</sup>

#### INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Frascos de cultivo MYCO/F-Sputa:** Almacenar en un lugar seco entre 2 y 25 °C y fuera de la luz directa.

**NO** usar después de la fecha de caducidad.

**Suplemento antibiótico BACTEC PANTA/F:** Almacene el **BACTEC PANTA/F** sin reconstituir entre 2 y 8 °C. Una vez reconstituido, debe usarse inmediatamente o almacenarse congelado entre -20° y -70 °C por un periodo de hasta seis meses. **NO** descongele y vuelva a congelar. Proteja de la luz. Debe evitarse el calentamiento excesivo.

**NO** usar después de la fecha de caducidad.

#### PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Los esputos u otras muestras respiratorias deben digerirse, descontaminarse y concentrarse antes de su inoculación en los frascos de medio de cultivo MYCO/F para esputos. Se recomienda el uso del método del hidróxido sódico de N-acetil-L-cisteína.<sup>6,7,8</sup> Alternativamente, el equipo **BBL MycoPrep** puede usarse para el procesamiento de la muestra. Otros métodos de descontaminación no han sido probados en conjunción con el medio MYCO/F-Sputa. Después de la centrifugación (≥ 3.000 x g, 15 min), el sedimento deberá resuspenderse en un tampón de fosfato estéril, pH 6.8.

El procesamiento de las muestras procedentes de fuera del aparato respiratorio, no sanguíneas, debe realizarse según el Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> CDC Manual, o como define el manual de procedimientos correspondiente a su laboratorio.

#### PROCEDIMIENTO

**El medio MYCO/F-Sputa debe utilizarse con el instrumento BACTEC 9000MB de la serie fluorescente.**

**Materiales suministrados:** Frascos de cultivo **BACTEC MYCO/F-Sputa**, suplemento antibiótico **BACTEC PANTA/F** y suplemento para medios **BACTEC** Suplemento/F.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Centrífuga; cámara de seguridad biológica; autoclave; incubador con CO<sub>2</sub> a 37 °C; tubos de centrifuga de 50 mL de la serie **Falcon**; hidróxido de sodio al 4%; solución de citrato de sodio al 2,9%; N-acetil-L-cisteína en polvo; tampón de fosfato, pH 6,8; vórtex; pipetas de transferencia estériles; jeringas de tuberculina estériles con aguja de calibre 25; desinfectante micobactericida; alcohol isopropílico al 70%; agar micobactericida o medio que contenga huevo; caldo 7H9; solución salina estéril; organismos para el control de calidad (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841; y *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478); microscopio y materiales para la tinción de portaobjetos.

#### Inoculación de los frascos de cultivo MYCO/F-Sputa

1. Desprenda el tapón a presión del frasco **BACTEC** e inspeccione el frasco para ver si hay roturas, contaminación, turbidez excesiva o membrana de goma hinchada o hundida. **NO LO UTILICE** si observa cualquier defecto.
2. Marque el frasco de cultivo con la identificación de la muestra.
3. Reconstituya el frasco **BACTEC PANTA/F** liofilizado con 10 mL del **BACTEC** Suplemento/F utilizando una jeringa con punta de tipo **Luer-Lok** adaptada con una aguja de calibre 25. **NO** deben utilizarse agujas que tengan un calibre mayor de 20. Las agujas mayores pueden dañar permanentemente la membrana de goma del frasco. Mezcle bien el contenido. Inspeccione visualmente el contenido del frasco para asegurarse de la disolución completa del suplemento antibiótico **BACTEC PANTA/F**.
4. Para muestras del aparato respiratorio y muestras no estériles, los frascos de medio MYCO/F para esputos que vayan a ser inoculados deben suplementarse con 2,0 mL de la solución **BACTEC PANTA/F** reconstituida. Los frascos suplementados deben ser inoculados en el plazo de dos horas después de la adición de la solución **BACTEC PANTA/F**. Antes de inocularlos con la solución **BACTEC PANTA/F**, limpie la membrana de goma con alcohol isopropílico al 70%. Se recomienda utilizar una jeringa de tuberculina con una aguja fija de calibre 25. Se deberá utilizar la técnica de inoculación con una sola mano y un soporte adecuado para el frasco para evitar el riesgo de pincharse accidentalmente con la aguja. Para muestras de tejido u otras muestras de partículas, se recomienda utilizar una aguja de mayor tamaño (calibre 20 – 22) y una jeringa con una punta de la marca **Luer-Lok** o de tipo similar. Para fluidos corporales estériles no sanguíneos (por ej. fluido sinovial, peritoneal), los frascos de medio **BACTEC MYCO/F-Sputa** deben ser suplementados con 2,0 mL de **BACTEC** Suplemento/F antes de la inoculación. Antes de inocular el **BACTEC** Suplemento/F, limpie la membrana con una torunda impregnada en 70% de alcohol isopropílico. Se recomienda utilizar una jeringa de tuberculina con aguja fija de calibre 25. Debe emplearse una técnica de inoculación utilizando una sola mano y un portafrascos apropiado para prevenir las lesiones accidentales de punción por aguja.
5. De forma aseptica, inyecte 0,5 mL de la muestra procesada en cada frasco utilizando una jeringa de tuberculina con aguja de calibre 25. La inserción y extracción de la aguja deberá hacerse de forma vertical, evitando movimientos laterales que pudieran dañar permanentemente la membrana de goma. Limpie la membrana de goma con un desinfectante micobactericida, seguido de alcohol isopropílico al 70%. Los frascos inoculados deberán ser colocados en el sistema **BACTEC 9000MB** de la serie fluorescente tan pronto como sea posible, pero ante todo el mismo día en que la muestra fue descontaminada, procesada e inoculada en los frascos de cultivo **BACTEC MYCO/F-Sputa**.

En este momento, también deben inocularse los medios convencionales como Lowenstein-Jensen 7H10/7H11.

- Los frascos que se ponen en el instrumento serán analizados automáticamente durante el período del protocolo de la prueba. El sistema **BACTEC 9000MB** identificará los frascos positivos (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC 9000MB, MA-0092**). Es posible que no haya una diferencia visible en el indicador entre frascos positivos o negativos. Sin embargo, el sistema **BACTEC 9000MB** puede determinar una diferencia en la fluorescencia del indicador.
- Los frascos positivos deben ser subcultivados y utilizados para preparar una citología ácido-rápida.

Procesamiento de un frasco identificado como positivo por el instrumento:

- Remueva el frasco del instrumento.
- En una cámara de seguridad biológica, ventile el frasco para equilibrar la presión del frasco con la atmósfera.
- Invierta el frasco para mezclar el contenido.
- Colecte una alícuota del frasco (aproximadamente 0,1 mL) para preparaciones de tinción (bacilos ácido-resistentes y tinciones de Gram).
- Inspeccione el frotis y el resto de las preparaciones. Informe los resultados preliminares solamente después de la evaluación de la tinción ácido-resistente.

**Si es positivo a bacilos ácido-resistentes**, subcultive en medio sólido e informe como: detección positiva por el instrumento, positivo a bacilos ácido-resistentes, identificación pendiente.

**Si otros microorganismos además de bacilos ácido-resistentes son detectados**, informe como: detección positiva por el instrumento, negativo a bacilos ácido-resistentes, contaminado.

**Si no se detectan microorganismos en los frotis**, vuelva a introducir el frasco en el instrumento como un frasco negativo y continúe la prueba hasta finalizar el protocolo. Sin resultado para el informe.

Los líquidos de los frascos de cultivo **BACTEC MYCO/F-Sputa** pueden utilizarse para subcultivos para la identificación y análisis de sensibilidad a antibióticos.

**Subcultivos y reapertura de los frascos:** Los subcultivos deben efectuarse en una cámara de seguridad biológica. El operario debe llevar puesta ropa de protección, incluyendo guantes y mascarilla. Antes de hacer el subcultivo, colocar el frasco en posición vertical y colocar un trozo de algodón empapado en alcohol sobre la membrana de goma. A fin de dejar escapar cualquier presión positiva que se haya podido producir en el interior del frasco debido al crecimiento de contaminantes, introduzca una aguja estéril de calibre 25 (o menor), equipada con un filtro o tapón adecuado, a través del trozo de algodón empapado en alcohol y la membrana de goma. La aguja debe retirarse una vez reducida la presión y antes de tomar la muestra para efectuar el subcultivo. La inserción y retirada de la aguja deberá hacerse en línea recta, evitando movimientos laterales que pueden dañar la membrana de goma. Para subcultivar el frasco al que se le ha liberado la presión, inviértalo para mezclar bien el contenido e inserte una jeringa nueva, con una aguja de calibre 25, para retirar el medio de cultivo para el procesamiento posterior. **No vuelva a poner el capuchón a la aguja. Deseche las agujas y jeringas en un contenedor para material biológicamente peligroso resistente a pinchazos.**

El usuario puede volver a poner en el instrumento cualquier frasco que haya dado una citología negativa para el control continuado durante el protocolo de la prueba. Al cabo de seis semanas de incubación, evalúe visualmente todos los frascos que el instrumento haya detectado como negativos. Si al final del protocolo de la prueba, un frasco aparece visualmente positivo (es decir, con turbidez, con posibles agregados de micobacterias), éste deberá ser subcultivado, teñido con la técnica ácido-rápida y tratado como posible positivo, siempre y cuando el resultado de la tinción ácido-rápida sea positivo. Si el frasco no muestra señales de positividad, éste debe esterilizarse antes de desecharse.

## CONTROL DE CALIDAD

Los certificados de control de calidad se incluyen en cada caja de medios.

Se recomienda que después de recibir cada lote nuevo de medios de cultivo **BACTEC MYCO/F-Sputa**, éste sea evaluado con los microorganismos de prueba de la ATCC identificados en la siguiente tabla como controles positivos y con un frasco sin inocular como control negativo.

Organismo	Margen de tiempo de detección (días)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 a 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 a 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 a 12

Para preparar el frasco de control positivo:

- Cultive el organismo en caldo 7H9.
- Prepare una suspensión McFarland N° 1 ( $\approx 10^7$  UFC/mL) del organismo utilizando solución salina estéril.
- Diluir la suspensión a una concentración de  $10^4$  UFC/mL con solución salina estéril.
- Inocular 1 mL de esta suspensión en un frasco de cultivo MYCO/F para esputos que ha sido suplementado con 2,0 mL de **BACTEC PANTA/F** reconstituido. Inóculos de 1 mL deben utilizarse para los organismos de control de calidad únicamente.

Los frascos de control positivo y negativo deben ser ubicados en el instrumento y analizados. El frasco de control positivo debe ser detectado como positivo por el instrumento dentro del margen de tiempo especificado en la tabla anterior. El control negativo debe permanecer negativo. Si cualquiera de estos frascos no muestra los resultados esperados, no utilice los medios hasta que se haya comunicado con su representante local de BD.

Para obtener información acerca del control de calidad para el sistema **BACTEC 9000MB**, consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC 9000MB (MA-0092)**.

## RESULTADOS

El sistema **BACTEC 9000MB** determina que una muestra de cultivo sea positiva y luego ésta se confirma mediante la citología ácido-rápida. Un resultado positivo indica la presencia presunta de microorganismos viables dentro del frasco.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

### Contaminación

Se debe procurar evitar la contaminación externa de la muestra durante la recolección, digestión, descontaminación e inoculación en el frasco **BACTEC**. Debido a la riqueza nutritiva del medio y a la naturaleza no selectiva de la detección fluorescente del consumo de oxígeno, es posible que aumenten las posibilidades de contaminación. Además, los procedimientos de digestión y descontaminación deberán llevarse a cabo cuidadosamente para disminuir la contaminación ocasionada por organismos que no sean micobacterias. Analice solamente los tipos de muestra indicados. Un frasco contaminado dará una lectura positiva pero no indicará un resultado clínico pertinente. El usuario debe tomar esta determinación en base a factores tales como el resultado de la citología ácido-rápida, el tipo de organismo recuperado, la presencia del mismo organismo en varios cultivos, la historia clínica del paciente, etc. (Consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC 9000MB, MA-0092**, para el procedimiento de redescartaminación de los frascos).

Se recomienda la descontaminación con el método de hidróxido de sodio N-acetil-L-cisteína (NALC-NaOH). Otros métodos de descontaminación no han sido probados en conjunción con el medio **BACTEC MYCO/F-Sputa**. Los descontaminantes por digestión pueden causar efectos dañinos en micobacterias.

### Tipo de muestra

Los frascos de cultivo **BACTEC MYCO/F-Sputa**, con **BACTEC** Suplemento/F y mezcla antibiótica **BACTEC PANTA/F** añadidos, cuando sea necesario, se utilizan para el cultivo y recuperación de muestras clínicas descontaminadas y digeridas y fluidos corporales estériles no sanguíneos. El nivel de detección mínimo de esta prueba puede variar según las especies micobacterianas presentes.

**NO UTILIZAR** los frascos de cultivo con medio MYCO/F para esputos para la recuperación de micobacterias a partir de sangre.

Los fluidos pleurales pueden contener eritrocitos y leucocitos<sup>10</sup> que tienen una rápida velocidad de metabolismo oxidativo que puede originar una falsa positividad.

### Consideraciones generales

La detección de especies micobacterianas en muestras clínicas depende del número de organismos presentes en la muestra, de los métodos de colección, factores del paciente como la presencia de síntomas, tratamientos previos, y el método de procesamiento. El seguimiento de las instrucciones en el procedimiento es crítico para la recuperación óptima de micobacterias. La contaminación con micobacterias saprofiticas en agua corriente o en otros reactivos y equipos de laboratorio puede ocasionar resultados falso positivos.

La recuperación óptima se obtiene cuando se añaden a cada frasco 0,5 mL del inóculo de la muestra procesada y resuspendida. El grado de digestión y descontaminación usado para procesar la muestra también puede afectar la recuperación y el tiempo necesario para la detección.

Las micobacterias pueden variar en su ácido-resistencia dependiendo de la cepa, tiempo de cultivo y otras variables. Todos los frascos detectados como positivos por el instrumento o que aparezcan turbios al final del protocolo de prueba deben ser subcultivados tanto en medios selectivos para micobacterias como en medios no selectivos. Las especies no micobacterianas pueden sobrepasar el crecimiento de las micobacterias presentes. Estos frascos de cultivo se deben volver a descontaminar y cultivar. (Refiérase al Manual del usuario del sistema **BACTEC** 9000MB, MA-0092, para el procedimiento de redescontaminación).

Las características de morfología y pigmentación pueden ser determinadas solamente en medios sólidos. Se deben llevar a cabo pruebas adicionales de identificación para determinar la especie de micobacterias a partir de un frasco de cultivo MYCO/F para esputos que resulte positivo.

Los frascos de cultivo **BACTEC** MYCO/F-Sputa que parecen ser positivos pueden contener una o más especies de micobacterias y/u otras especies que no son micobacterias. La identificación de las micobacterias presentes requiere el subcultivo en medios sólidos y procedimientos adicionales para identificar los organismos presentes. Todavía no se ha establecido la coherencia de la morfología microscópica en el **BACTEC** MYCO/F-Sputa.

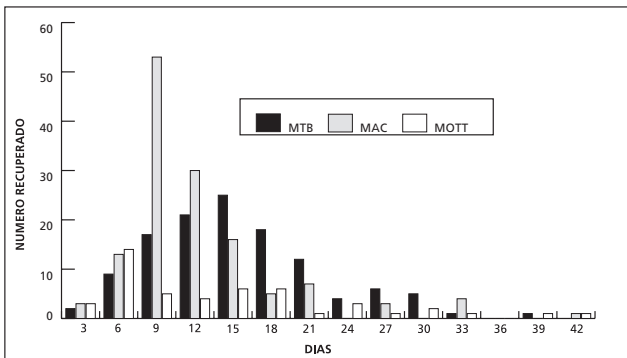
Los frascos de cultivo **BACTEC** MYCO/F-Sputa son incubados a 37 °C para excluir potencialmente la recuperación de micobacterias que requieren de otras temperaturas de incubación (como por ejemplo, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). La recuperación de dichos organismos requiere métodos de cultivo adicionales. Los organismos con requerimientos de crecimiento especiales (como por ejemplo, *M. haemophilum*) pueden no recuperarse en **BACTEC** MYCO/F-Sputa cuando se incuban a la temperatura adecuada. Los siguientes aislados fueron detectados como positivos en el sistema **BACTEC** 9000MB utilizando frascos de cultivo **BACTEC** MYCO/F-Sputa durante estudios internos y/o estudios clínicos: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium xenopi*.

El uso del suplemento antibiótico **BACTEC PANTA/F**, aunque necesario para todas las muestras no estériles, puede causar efectos inhibitorios en algunas micobacterias.

Los subcultivos terminales no fueron realizados rutinariamente durante los estudios clínicos. En consecuencia, una tasa actual de falsos positivos, definida como un frasco de cultivo MYCO/F para esputos que permanece negativo a lo largo de las seis semanas del período de incubación, fue subcultivada y no se han podido detectar organismos micobacterianos hasta el momento.

### RESULTADOS PREVISTOS

**La frecuencia de distribución del tiempo de recuperación para muestras del aparato respiratorio en los estudios clínicos en el sistema BACTEC 9000MB es ilustrada en la siguiente figura.**



### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

#### Muestras del aparato respiratorio

El sistema **BACTEC** 9000MB fue evaluado en cuatro sitios clínicos incluyendo tanto laboratorios como grandes hospitales de cuidado intensivo en áreas geográficas diversas. La población en el sitio de estudio incluyó pacientes infectados con VIH, pacientes inmunocomprometidos y pacientes de trasplante. El sistema **BACTEC** 9000MB fue comparado con el sistema radiométrico **BACTEC** 460TB y con el sistema convencional de cultivo en medio sólido para la recuperación y detección de micobacterias en muestras del aparato respiratorio. Un total de 3135 muestras del aparato respiratorio fueron analizadas durante el estudio y se recuperó un total de 348 aislados positivos para micobacterias patógenas. De estos positivos, 292 (84%) fueron recuperados en el sistema **BACTEC** 9000MB, 260 (75%) fueron recuperados en el sistema radiométrico **BACTEC** 460TB y 178 (51%) fueron recuperados en medio sólido (Lowenstein-Jensen). El sistema **BACTEC** 9000MB combinado con el medio sólido recuperaron 89,6% del total de los aislados patógenos. Para organismos no patógenos MOTT\* (otras micobacterias además de tuberculosis), el número total de aislados positivos recuperados en el estudio fue 40. De estos positivos, 16 (40%) fueron recuperados en el sistema **BACTEC** 9000MB, 24 (60%) fueron recuperados en el sistema radiométrico **BACTEC** 460TB y cinco (13%) fueron recuperados en el medio sólido. El sistema **BACTEC** 9000MB combinado con los medios sólidos recuperó el 50% del total de micobacterias no patógenas MOTT.

(\*No patógenos MOTT incluidos *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. terrae*)

El sistema **BACTEC** 9000MB falló en la recuperación de 1,8% de los aislados patógenos que fueron recuperados con uno o más de los sistemas de referencia (**BACTEC** 460TB o medios sólidos convencionales). Aún cuando este porcentaje representa una pérdida potencial en la recuperación, no es indicativo de una determinación actual de falsos negativos (refiérase a la sección de limitaciones). El uso de un segundo medio, como es recomendado, ayudará a incrementar las probabilidades de recuperación de organismos micobacterianos. El sistema **BACTEC** 9000MB demostró una tasa de falsos positivos del 1,5% (detectado positivo por el instrumento, negativo por subcultivo o citología). La tasa de control de contaminación general con el sistema **BACTEC** 9000MB fue del 6,5%.

Especies aisladas	Total aislados	TOTAL 9000MB	9000MB SOLAMENTE	TOTAL 460TB	460TB SOLAMENTE	TOTAL LJ	LJ SOLAMENTE
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
Complejo <i>M. avium</i>	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. gordonae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
otras especies de <i>M.</i>	5	5	2	1	0	3	0
TOTAL AISLADOS	388	308	76	284	56	183	15

#### Muestras de fuera del aparato respiratorio:

En un estudio independiente realizado en un gran hospital universitario, 803 muestras de fuera del aparato respiratorio fueron analizadas con el medio de cultivo BACTEC MYCO/F-Sputa, medio de cultivo BACTEC 12B y medio convencional (Lowenstein-Jensen). El número total de aislados positivos para micobacterias patógenas recuperado por el estudio fue 38. De estos aislados positivos, el sistema BACTEC 9000MB recuperó 29 (76,3%), 30 (78,9%) fueron recuperados por el sistema BACTEC 460TB y 24 (63,2%) fueron recuperados por el medio convencional (Lowenstein-Jensen). El sistema BACTEC 9000MB combinado con los medios sólidos recuperaron el 89,5% del total de los aislados patógenos. El total de las muestras positivas (micobacterias patógenas y no patógenas) fue distribuido entre las fuentes siguientes: aparato gástrico (5,1%), fluidos corporales estériles no sanguíneos (17,9%), heces (10,3%), superficie cutánea/fluido de drenaje de heridas (5,1%), tejido (53,8%) y orina (7,7%). Los siguientes aislados fueron detectados como positivos por el sistema BACTEC 9000MB utilizando MYCO/F para esputos en este estudio clínico: *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. bovis*. El porcentaje global de falsos positivos (positivo por el instrumento, negativo por el frotis y/o subcultivo) fue del 5,0%. Debido a la variedad de muestras recogidas y analizadas, el porcentaje de falsos positivos difirió significativamente del porcentaje que ha sido comunicado anteriormente para muestras del aparato respiratorio. La frecuencia de niveles detectables mínimos de contaminación de las muestras habitualmente estériles (es decir, tejido y fluidos corporales no sanguíneos estériles) varió entre 4,7% y 18,9%; para las muestras no estériles (es decir, gástricas, fecales, urinarias, superficie cutánea/fluido de drenaje de heridas) varió entre 8,2% y 73,9%. La frecuencia global de niveles detectables mínimos de contaminación fue del 14,9%.

**REFERENCIAS:** Ver "References" en el texto en inglés.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD.

## BD BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas Supplementeret Middlebrook 7H9 bouillon

Dansk

### TILSIGTET BRUG

BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsmediet (modificeret Middlebrook 7H9 bouillon med CO<sub>2</sub>) med tilførsel af BACTEC Supplement/F og BACTEC PANTA/F-antibiotisk blanding bruges sammen med BACTEC 9000MB fluorescent serie-instrumentet som en kvalitativ procedure til *in vitro*-dyrkning og opsamling af mycobakterier. De prøver, der accepteres, er afkogte, dekontaminerede, kliniske prøver og andre sterile kropsvæsker end blod.

### RESUMÉ OG FORKLARING

Siden midten af firserne og spredningen af AIDS-epidemien er *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) og andre mycobakterier end tuberkulose (MOTT) — især *Mycobacterium avium* complex (MAC) — genopblomstret. Fra 1985 til 1992 steg antallet af rapporterede tilfælde af MTB-tilfælde med 18%. Det anslås, at tuberkulose på verdensplan stadig dræber 3 millioner mennesker årligt, hvilket gør den til den førende, dødelige infektionssygdom.<sup>1</sup> Mellem 1981 og 1987 viste undersøgelser af AIDS-tilfælde, at 5,5% af AIDS-patienterne havde disseminerede, ikke-tuberkuløse, mycobakterieinfektioner som f.eks. MAC. I 1990 havde de øgede tilfælde af disseminerede, ikke-tuberkuløse, mycobakterieinfektioner resulteret i en kumulativ forekomst på 7,6%.<sup>2</sup> Ud over genopblomstringen af MTB er multiresistent MTB (MDR-TB) blevet et stigende problem. Forskning af dyrkningen, identifikationen og rapporteringen af disse MDR-TB-tilfælde i laboratoriet bidrog delvist til spredningen af sygdommen.

Centrene for sygdomskontrol og –forebyggelse (CDC) har anbefalet, at der skal gøres alt for, at laboratorierne kan benytte de hurtigste metoder til at diagnosticere mycobakterier. Disse anbefalinger inkluderer brugen af både flydende og faste medier til dyrkning af mycobakterier.<sup>3</sup>

BACTEC 9000MB-systemet er udviklet til hurtig detektering af mycobakterier i kliniske prøver, der ikke består af blod. Systemet indeholder et flydende dyrkningsmedium (MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas), et vækstsupplement (Supplement/F) og et antibiotisk supplement (BACTEC PANTA/F). BACTEC Supplement/F indeholder vækstfremmere til mycobakterier og kan også bruges til at rekonstituere BACTEC PANTA/F. BACTEC PANTA/F indeholder antimikrobielle stoffer, der bruges til at undertrykke væksten af kontaminerende eller normalflora-mikroorganismer, der kan overleve dekontamineringsprocessen, og det anbefales som tilsætning til alle ikke-sterile prøver. Hvert dyrkningsglas indeholder en sensor, der kan detektere faldet i den ilt, der er opløst i mediet, der skyldes mikroorganismers stofskifte og vækst. Instrumentet overvåger stigningen af sensorens fluorescens, der er proportional med faldet i den opløste ilt. En positiv aflæsning angiver den formodede tilstedeværelse af levedygtige mycobakterier i dyrkningsglasset. Detektionen er begrænset til de mikroorganismer, der kan vokse i det pågældende medium.

### PROCEDURENS PRINCIPPER

Kliniske prøver, der ikke er blod, indsamles og behandles ifølge standardprocedurerne for opsamling af mycobakterier. Behandlede prøver inokuleres med en kanyle og sprøjte i et BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas, der er tilsat BACTEC Supplement/F og/eller BACTEC PANTA/F alt afhængig af prøvetypen (se procedureafsnittet). Patientoplysninger indtastes i systemets computer, og dyrkningsglasset tildes via strekkodemenuen en plads i instrumentet. Dyrkningsglasset placeres i BACTEC 9000MB-systemet og inkuberes kontinuert ved 37 °C med bevægelse hvert 10. minut for at få den maksimale opsamling. Ånding af levedygtige, aerobe mikroorganismer i et MYCO/F-Sputa-glas resulterer i en nettoformindskelse af ilt i det pågældende glas. En øgning af sensorens fluorescens i glasset skyldes forbrug af den opløste ilt. Hvert dyrkningsglas overvåges hvert 10. minut af BACTEC 9000MB-systemet for at se øgningen af fluorescensen. En analyse af ændringen af iltindholdet bruges til at bestemme, om glasset er positivt, dvs. om prøven indeholder levedygtige organismer. Dyrkningsglas, der forbliver negative i mindst 42 dage (op til 56 dage), og som ikke viser synlige tegn på at være positive, skal fjernes fra instrumentet og steriliseres, inden de smides ud.

## REAGENSER

**BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsglassene** indeholder følgende aktive ingredienser (inden behandling):

### Ingrediensoversigt

Behandlet vand	..... 40 mL	Ammoniumsulfat	..... 0,05% w/v
7H9 Middlebrook bouillon	..... 0,47% w/v	Ferroammoniumcitrat	..... 0,006% w/v
Kasein-hydrolysat	..... 0,10% w/v	Polysorbat 80	..... 0,0025% w/v
Supplement H	..... 0,30% w/v	Hæmin	..... 0,0005% w/v
Glycerol	..... 0,10% w/v		

Alle **BACTEC**-medier leveres med tilsat CO<sub>2</sub>. Sammensætningen kan være blevet justeret for at leve op til bestemte ydelseskrav.

Inden inkulering af luftvejs- og ikke-sterile prøver skal hvert 40 mL-glas med **BACTEC MYCO/F-Sputa medium** tilsættes 2,0 mL **BACTEC PANTA/F** antibiotisk supplement som rekonstitueret med **BACTEC Supplement/F**. Inden inkulering af andre sterile kropsvæsker end blod skal hvert 40 mL glas med **BACTEC MYCO/F-Sputa medium** tilsættes 2,0 mL **BACTEC Supplement/F**. Se indlægsedlen til **BACTEC PANTA/F** (PP-102) og **BACTEC Supplement/F** (PP-103) for at få yderligere oplysninger.

## ADVARSLER

**Forholdsregler:** Til *in vitro*-diagnostik brug.

Dette produkt indeholder tørt naturgumi.

**POTENTIelt SMITSOMME PRØVER.** Overhold de "universelle forholdsregler"<sup>4,5</sup> og institutionelle retningslinier ved håndtering og bortskaffelse af smitsomt materiale.

Biosikkerhedsniveau 2-praksis samt opbevaringsudstyr og -faciliteter anbefales til klargøring af syrefaste farvninger og dyrkning af kliniske prøver. Ved aktiviteter, der involverer dyrkning og håndtering af *Mycobacterium tuberculosis* eller *Mycobacterium*-arter, der er dyrket i kultur, anbefales biosikkerhedsniveau 3-praksis samt opbevaringsudstyr og -faciliteter ifølge CDC.<sup>6</sup>

Hvert dyrkningsglas skal inden brug undersøges for tegn på kontaminering såsom uklarheder, bulnende eller indsunken membran eller lægge. I sjældne tilfælde kan halsen på dyrkningsglasset være revnet, så halsen knækker ved fjernelse af hættens eller ved håndtering. Der kan også være utilstrækkelig sammenklæmning af hættens på et glas. Dette ses ved, at metalanten i bunden af hættens ikke er jævnt rullet ind under kanten på glassets hals. I begge tilfælde kan glassets indhold løbe ud — især hvis det vendes på hovedet. **MÅ IKKE BRUGES**, hvis et dyrkningsglas udviser tegn på kontaminering, beskadigelse eller utilstrækkelig sammenklæmning.

For at minimere risikoen for lægge under inkulering af prøven i dyrkningsglassene skal man bruge en tuberkulinkanyle med fast nål størrelse 25. Der skal bruges en et-håndsinokuleringssteknik og en passende glasholder for at forhindre, at man risikerer at stikke sig på kanylen. **Man må IKKE bruge kanyler, der er større end 20 G.** Brug af tykkere kanyler ved tilsætning af supplement, trykudligning eller videre dyrkning kan beskadige membranen permanent og forårsage lægge.

**Positive dyrkningsglas til videre dyrkning eller farvning etc.:** Inden prøveudtagning er det nødvendigt at frigøre de luftarter, der ofte dannes ved mikroorganismernes stofskifte. Prøveudtagning skal foretages i et biologisk sikkerhedskab, og man skal bære passende beskyttelsestøj inkl. handsker og maske. Se **PROCEDUREAFSNITTET** for at få mere at vide om videre dyrkning.

Et kontamineret glas kan indeholde et overtryk. Hvis der udtages prøver i et kontamineret glas, kan luft og/eller kontamineret medium slippe ud af glasset og udgøre en luftformig sundhedsrisiko. Kontaminering af dyrkningsglas er ikke nødvendigvis umiddelbart synlig.

Sterilisér alle inkulerede MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas vha. autoklaving, inden de smides ud.

## LÆKKENDE ELLER SKÅREDE GLAS

Hvis et inkuleret dyrkningsglas lækker eller går i stykker ved et uheld, skal man benytte den procedure, der er etableret i dit laboratorium, ved spild af mycobakterier. Man skal som et minimum benytte sig af de "universelle forholdsregler." Det anbefales at bruge et godkendt åndedrætsværn. Et glas, der har en minimal lægge, der begrænser sig til membranen og hættens, kan desinficeres lokalt vha. et mycobakteriedræbende desinfektionsmiddel efterfulgt af 70% isopropylalkohol. Hvis dette skulle ske inde i instrumentet, er der en potentiel risiko for at blive udsat for aerosoler. Sluk for instrumentet, og luk straks dørene. Evakuér det berørte område. Kontakt sikkerhedschefen. Afgør nødvendigheden af at slukke for eller foretage ændringer af indstillingerne af de enheder, der behandler luften i det berørte område. Vend ikke tilbage til området, før alle potentielt skadelige aerosoler har lagt sig eller er blevet fjernet vha. passende ventilation. BD Diagnostics bør underrettes ved at kontakte den lokale BD-repræsentant. CDC har udsendt retningslinier for korrekt håndtering af mycobakteriel kontaminering pga. brud på dyrkningsglas eller bouillonopløsninger.<sup>6</sup>

## OPBEVARINGSINSTRUKTIONER

**MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas:** Opbevares tørt ved 2 – 25 °C og **ikke i direkte lys**.

**MÅ IKKE** bruges efter udløbsdatoen.

**BACTEC PANTA/F antibiotikasupplement:** Opbevar ikke-rekonstitueret **BACTEC PANTA/F** ved 2 – 8 °C. Når det er rekonstitueret, skal det straks bruges eller fryses ved -20 til -70 °C i op til seks måneder. **MÅ IKKE** genindfryses efter optøning. Beskyttes mod lys. Undgå overophedning.

**MÅ IKKE BRUGES** efter udløbsdatoen.

## BEHANDLING AF PRØVER

Spyt eller andre luftvejsprøver skal afkoges, dekontamineres og koncentrerer, inden de inkuleres i MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas. N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid-metoden anbefales.<sup>6,7,8</sup> Man kan også bruge **BBL MycoPrep**-sættet til behandling af prøven. Man har ikke undersøgt andre dekontamineringsmetoder sammen med MYCO/F-Sputa-mediet. Efter centrifugering (≥ 3.000 × g i 15 min.) skal sedimentet genopløses i steril fosfatbuffer, pH 6,8.

Behandling af prøver, der ikke kommer fra luftvejene, og som ikke er blod, skal udføres ifølge Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> CDC-manualen eller som defineret i din individuelle laboratoriproceduremanual.

## PROCEDURE

**MYCO/F-Sputa-medium skal bruges sammen med BACTEC 9000MB fluorescent serie-instrumentet.**

**Medfølgende materialer:** **BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas**, **BACTEC PANTA/F** antibiotisk supplement og **BACTEC Supplement/F**-mediesupplement.

Nødvendige materialer, der ikke medfølger: Centrifuge; biologisk sikkerhedskab; autoklave; CO<sub>2</sub>-inkubator ved 37 °C; 50 mL **Falcon**-centrifugeglas; 4% natriumhydroxid; 2,9% natriumcitratopløsning; N-acetyl-L-cysteinpulver; fosfatbuffer pH 6,8; vortexmixer; sterile pipetter til overføring; steril tuberculinprøje med en kanylen størrelse 25 G; mycobakteriedræbende desinfektionsmiddel; 70% isopropylalkohol; mycobakteriel agar eller æggebaseret medium; 7H9 bouillon; steril saltvand; kvalitetskontrolorganismer (*Mycobacterium tuberculosis* - ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum* - ATCC 6841; og *Mycobacterium kansasii* - ATCC 12478); mikroskop og materialer til farvning af objektglas.

## INKULERING AF MYCO/F-SPUTA-DYRKNINGSGLAS

1. Fjern hættens på **BACTEC**-glasset, og kontroller dyrkningsglasset for revner, kontaminering, uklarheder og bulnende eller indsunken membran. **MÅ IKKE BRUGES**, hvis der observeres nogen defekter.
2. Mærk dyrkningsglasset, så prøven kan identificeres.
3. Rekonstituer det frysetørrede **BACTEC PANTA/F**-glas med 10 mL **BACTEC Supplement/F** ved brug af en sprøjte med en **Luer-Lok**-spids, hvor der er påsat en kanylen størrelse 25 G. Man må **IKKE** bruge kanyler, der er større end 20 G. Tykkere kanyler kan skade membranen permanent. Bland indholdet omhyggeligt. Kontroller glassets indhold visuelt for at sikre at det **BACTEC PANTA/F**-antibiotiske supplement er opløst.

- Til luftvejs- og ikke-sterile prøver skal de MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas, der skal inokuleres, tilsættes 2,0 mL af den rekonstituerede **BACTEC PANTA/F**-opløsning. Dyrkningsglas med supplement skal inokuleres inden for 2 timer efter tilsætningen af **BACTEC PANTA/F**-opløsningen. Tør membranen af med 70% isopropylalkohol, inden inokulering med **BACTEC PANTA/F**-opløsningen. Det anbefales at bruge en tuberkulinsprøjte med en fastmonteret nål størrelse 25 G. Der skal bruges en et-håndsinokuleringsteknik og en passende glasholder for at forhindre, at man stikker sig på kanylen. Til vævsprøver eller andre partikelprøver anbefales det at bruge en tykkere kanyle (størrelse 20 – 22 G) og en sprøjte med en **Luer-Lok**-spids eller en lignende spids.  
I forbindelse med andre sterile kropsvæsker end blod (f.eks. ledvæske eller peritonealvæske) skal der tilsættes 2,0 mL **BACTEC Supplement/F** til **BACTEC MYCO/F-Sputa**-glas inden inokulering. Tør membranen af med 70% isopropylalkohol, inden inokulering med **BACTEC Supplement/F**. En tuberkulinsprøjte med en fastmonteret kanyle størrelse 25 G anbefales. Der skal bruges en et-håndsinokuleringsteknik og en passende glasholder for at forhindre, at man risikerer at stikke sig på kanylen.
- Injicér steril 0,5 mL behandlet prøve pr. glas vha. en tuberkulinsprøjte med en kanyle størrelse 25 G. Indsætningen og fjernelsen af kanylen skal foretages med en lige bevægelse uden drejende bevægelser, der vil kunne beskadige membranen. Tør membranen af med et mycobakteriedræbende desinfektionsmiddel efterfulgt af 70% isopropylalkohol. Inokulerede glas skal placeres i **BACTEC 9000MB**-systemet så hurtigt som muligt — i hvert fald samme dag som prøven er dekontamineret, behandlet og inokuleret i **BACTEC MYCO/F-Sputa**-dyrkningsglassene.  
På dette tidspunkt skal konventionelle medier såsom Lowenstein-Jensen eller 7H10/7H11 være blevet inokuleret.
- Dyrkningsglas, der er sat i instrumentet, testes automatisk, så længe testen varer. Positive dyrkningsglas identificeres af **BACTEC 9000MB**-systemet (se brugsanvisningen til **BACTEC 9000MB**, MA-0092). Sensoren i glasset ser ikke anderledes ud i positive i forhold til negative dyrkningsglas, men **BACTEC 9000MB**-systemet kan detektere en forskel i fluorescensen.
- Positive glas skal videredyrkes, og der skal klargøres et syrefast udstrykningspræparat.  
Behandling af et glas som instrumentet har identificeret som positivt:
  - Fjern glasset fra instrumentet.
  - Udlign trykket i glasset i et biologisk sikkerhedsskab.
  - Vend glasset for at blande indholdet.
  - Udtag en prøve fra glasset (ca. 0,1 mL) til farvning af præparater (syrefaste bakterier og Gram-farvninger).
  - Inspicér udstrykningen og præparater. Rapportér først de præliminære resultater efter evaluering af syrefastheden.

Hvis bakterierne er syrefaste, skal de videredyrkes på fast medium og rapporteres som: Instrument-positive, syrefast-positive, afventer identifikation.

Hvis der er andre mikroorganismer end syrefaste bakterier til stede, skal disse rapporteres som: Instrument-positive, syrefast-negative, kontaminerede.

Hvis der ikke er mikroorganismer i udstrykningerne, skal man sætte glasset tilbage i instrumentet som et igangværende negativt glas og lade det gennemgå undersøgelsesprotokollen. Intet rapportérbart resultat.

Subkulturer til identificering og undersøgelse af medikamentfølsomhed kan udføres med væske fra **BACTEC MYCO/F-Sputa**-dyrkningsglassene.

**Videredyrning og genoverførsel til glasset.** Videredyrning skal foretages i et biologisk sikkerhedsskab, og man skal bære passende beklædning, inkl. handsker og maske. Inden videredyrning skal glasset placeres lodret og en serviet med alkohol placeres over membranen. For at udligne et overtryk i glasset, der kan skyldes vækst af kontaminanter, skal man stikke en steril kanyle størrelse 25 G eller mindre, der er forsynet med et passende filter eller tampon, gennem den alkoholvædede serviet og membranen. Kanylen skal fjernes, når trykket er udlignet, og inden der udtages prøver til videredyrning. Indsætningen og fjernelsen af kanylen skal foretages med en lige bevægelse uden drejende bevægelser, der vil kunne beskadige membranen. For at videredyrke det trykudlignede glas skal man vende det for at blande indholdet godt og indsætte en ny sprøjte med en kanyle størrelse 25 G for at udtage dyrkningsmedium til videre behandling. Sæt ikke hæften på kanylen igen. **Bortskaf kanyler og sprøjter i en beholder til bioaffald, som pålemler ikke kan stikke igennem.**

Brugeren kan nære ønske om at sætte et glas med et negativt udstrykningsresultat tilbage i instrumentet til fortsat overvågning.

Efter seks ugers inkubering skal man udføre en visuel kontrol af alle instrumentnegative glas. Hvis glassene ser positive ud (dvs. er uklare med mulige klumper af mycobakterier) skal de videredyrkes, farves for syrefasthed og behandles som formodet positive, forudsat at de viser sig positive i undersøgelsen for syrefasthed. Hvis glasset ikke viser tegn på positivitet, skal det steriliseres inden bortskaffelse.

## KVALITETSKONTROL

Kvalitetskontrolcertifikater følger med hver pakke med medium.

Det anbefales, at hver ny levering eller parti **BACTEC MYCO/F-Sputa**-dyrkningsmedium testes med ATCC-kontrolorganismene, der er identificeret herunder, som positiv kontrol og et ikke-inokuleret glas som negativ kontrol.

Organisme	Tidsforløb inden detektion (dage)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 til 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 til 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 til 12

For at klargøre det positive kontrolglas:

- Dyrk organismen i 7H9-bouillon.
- Klargør en #1 McFarland ( $\approx 10^7$  CFU/mL)-suspension med organismen vha. steril saltvand.
- Fortynd opløsningen til  $10^4$  CFU/mL med steril saltvand.
- Inokulér 1 mL af denne opløsning i et MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas, der er tilsat 2,0 mL rekonstitueret **BACTEC PANTA/F**. **Inokulering med 1 mL må kun bruges i forbindelse med kvalitetskontrolorganismene.**

Det positive og det negative kontrolglas skal scannes af instrumentet og undersøges. Instrumentet skal identificere det positive kontrolglas som positivt inden for de rammer, der er angivet herover. Den negative kontrol skal forblive negativ. Hvis et af glassene ikke giver de ønskede resultater, skal du ikke bruge medierne, før den lokale BD repræsentant er blevet kontaktest.

Se brugsanvisningen til **BACTEC 9000MB** (MA-0092) for at få oplysninger om kvalitetskontrol af **BACTEC 9000MB**-systemet.

## RESULTATER

En positiv prøve identificeres af **BACTEC 9000MB**-systemet og bekræftes ved et syrefast opstrøg. En positiv aflæsning angiver den formodede tilstedeværelse af levedygtige mikroorganismer i dyrkningsglasset.

## BEGRÆNSNINGER AF PROCEDUREN

### Kontaminering

Man skal være omhyggelig med at forhindre ekstern kontaminering af prøven under prøvetagning, afkogningen, dekontamineringen og inokuleringen i **BACTEC**-glasset. Pga. mediets næringsrigdom og fluorescensdetektionen af iltforbrugtes ikke-selektive natur kan en kontaminering bryde igennem. Afkogning og dekontamineringsprocedurer skal udføres omhyggeligt for at reducere risikoen for, at en kontaminering med ikke-mycobakterielle organismer bryder igennem. Undersøg kun de angivne prøvetyper. Et kontamineret glas vil give en positiv aflæsning på instrumentet, men vil ikke angive et klinisk relevant resultat. En sådan afgørelse skal træffes af brugeren og baseres på faktorer såsom resultatet af syrefaste udstrykninger, hvilken type organisme, der er isoleret, tilstedeværelsen af den samme organisme i flere kulturer, sygdomsforløbet etc. (Se brugsanvisningen til **BACTEC 9000MB**, MA-0092, for at få oplysninger om dekontamineringsprocedurer for glas.)



Det anbefales at dekontaminere med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH). Man har ikke undersøgt andre dekontamineringsmetoder sammen med **BACTEC** MYCO/F-Sputa-mediet. Afkogningsdekontaminanter kan have skadelige virkninger på mycobakterier.

### Prøvetype

**BACTEC** MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas tilsat **BACTEC** Supplement/F og **BACTEC** PANTA/F bruges til dyrkning og opsamling af afkogte og dekontaminerede kliniske prøver og andre sterile kropsvæsker end blod. Minimumsdetektionsniveauet afhænger af, hvilke mycobakteriearter, der er til stede.

**BRUG IKKE** MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas til opsamling af mycobakterier fra blod.

Pleuralvæske kan indeholde røde og hvide blodlegemer, der kan have et højt oxiderende stofskefte, der kan resultere i falske positive.

### Generelle betragtninger

Detektionen af mycobakteriearter i kliniske prøver afhænger af antallet af organismer i prøven, de anvendte metoder til indsamling af prøverne og patientfaktorer såsom symptomer, tidligere behandling og behandlingsmetode. Overholdelse af instruktionerne angående procedurer er afgørende for optimal opsamling af mycobakterier. Kontaminering af postevand eller andre laboratoriereagenser og –udstyr med saprophyte mycobakterier kan give falske positive resultater.

Man opnår den optimale opsamling af isolater ved at tilsætte hvert glas 0,5 mL vandet og genopløst prøveinokulat. Graden af afkogning og dekontaminering af prøven kan også påvirke opsamlingstiden og den tid, der går, inden detektering.

Mycobakteriers syrefasthed kan variere alt afhængig af arten, kulturens alder og andre variable. Alle glas, der er positive ifølge instrumentet, eller som ser uklare ud ved undersøgelsens afslutning, skal videre dyrkes i både selektive og ikke-selektive mycobakteriemidler. Arter, der ikke er mycobakterier, kan udkonkurrere de tilstedeværende mycobakterier. Disse kulturglas skal dekontamineres og videre dyrkes igen. (Se brugsanvisningen til **BACTEC** 9000MB, MA-0092, for proceduren til gen-dekontaminering.)

Kolonimorfologi og pigmenteringskarakteristika kan kun bestemmes på faste medier. Yderligere identifikationstests kan udføres for at bestemme mycobakteriel artsdannelse fra et positivt MYCO/F-Sputa-glas.

**BACTEC** MYCO/F-Sputa-glas, der synes positive, kan indeholde en eller flere mycobakteriearter og/eller andre ikke-mycobakteriearter. Identifikation af de tilstedeværende mycobakteriearter kræver videre dyrkning på et fast medium og yderligere procedurer til at identificere organismene. Der er ikke eftervist konsistent, mikroskopisk morfologi i **BACTEC** MYCO/F-Sputa.

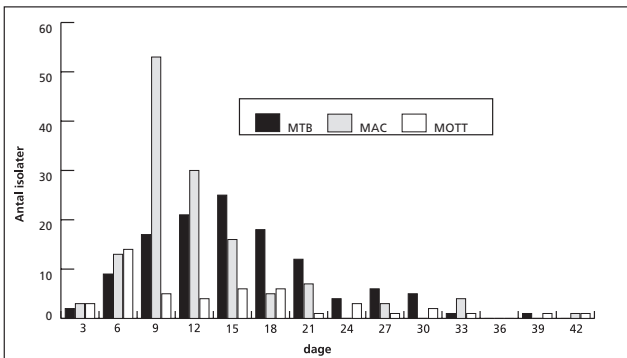
**BACTEC** MYCO/F-Sputa-glas inkuberes ved 37 °C, hvilket potentielt udelukker opsamlingen af mycobakterier, der kræver andre inkuberings temperaturer (f.eks., *M. marinum*, *M. ulcerans* og *M. haemophilum*). Opsamlingen af sådanne organismer kræver yderligere dyrkningsmetoder. Organismer med særlige vækstkrav (f.eks. *M. haemophilum*) kan ikke isoleres i **BACTEC** MYCO/F-Sputa, når de inkuberes ved den rette temperatur. Følgende isolater blev dømt positive af **BACTEC** 9000MB-systemet ved brug af **BACTEC** MYCO/F-Sputa ved både de interne og/eller kliniske undersøgelser. *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* og *Mycobacterium xenopi*.

Selv om det er nødvendigt at bruge **BACTEC** PANTA/F antibiotisk supplement til alle ikke-sterile prøver, kan det have en hæmmende effekt på visse mycobakterier.

Der blev ikke rutinemæssigt udført terminale videre dyrkninger under de kliniske undersøgelser. Derfor kan en falsk negativ defineret som et MYCO/F-Sputa-dyrkningsglas, der forblev negativt i hele den seks uger lange inkuberingsperiode, men som blev videre dyrket og viste sig at indeholde en mycobakterieorganisme, ikke bestemmes på dette tidspunkt.

### FORVENTEDE RESULTATER

Hyppigheden af opsamlingstider for luftvejsprøver i kliniske forsøg med **BACTEC** 9000MB-systemet er illustreret i følgende figur.



### YDELSESKARAKTERISTIKA

#### Luftvejsprøver

**BACTEC** 9000MB-systemet blev afprøvet på fire kliniske lokaliteter, der indbefattede offentlige sundhedslaboratorier såvel som store akutsygehuse i forskellige geografiske områder. Blandt de undersøgte var HIV-patienter, immunsvækkede patienter og transplantationspatienter. **BACTEC** 9000MB-systemet blev sammenlignet med både **BACTEC** 460TB-radiometrisystemet og konventionelle, faste dyrkningsmedier til opsamling og detektion af mycobakterier fra luftvejsprøver. Der blev undersøgt i alt 3135 luftvejsprøver i løbet af forsøgene. Det samlede antal positive isolater af patogene mycobakterier i undersøgelsen var 348. Ud af disse positive isolater blev 292 (84%) isoleret i **BACTEC** 9000MB-systemet, 260 (75%) blev isoleret i **BACTEC** 460TB-radiometrisystemet og 178 (51%) blev isoleret vha. faste dyrkningsmedier (Lowenstein-Jensen). **BACTEC** 9000MB-systemet og faste medier isolerede tilsammen 89,6% af det samlede antal patogene isolater. For ikke-patogene MOTT\* (Mycobakterier, der ikke er tuberkulose) blev der isoleret 40 positive isolater. Ud af disse positive isolater blev 16 (40%) isoleret i **BACTEC** 9000MB-systemet, 24 (60%) i **BACTEC** 460TB-radiometrisystemet og 5 (13%) på fast medium. **BACTEC** 9000MB-systemet og faste medier isolerede tilsammen 50% af det samlede antal ikke-patogene MOTT.

(\*Ikke-patogene MOTT indbefatter *M. gordonae*, *M. abscessus* og *M. terrae*.)

**BACTEC** 9000MB-systemet isolerede ikke 1,8% af de patogene isolater, der blev isoleret i et eller flere af referencsystemerne (**BACTEC** 460TB eller konventionelle faste medier). Selv om denne procentdel repræsenterer et potentielt tab af isolater, angiver den ikke, at der er blevet detekteret falske negative (se afsnittet om begrænsninger af proceduren). Som anbefalet vil brug af et andet medium øge sandsynligheden for opsamling af mycobakterieorganismer.

**BACTEC** 9000MB-systemet viste 1,5% falske positive (instrument-positive, udstyrings- og/eller videre dyrkningsnegative). Den samlede gennembrudsdekontaminering for **BACTEC** 9000MB-systemet var på 6,5%.

## Resumê af BACTEC 9000MB-systemets isolatopsamling under kliniske forsøg.

Isolerede prøver	Samlet isolates	SAMLET 9000MB	9000MB KUN	SAMLET 460TB	460TB KUN	SAMLET LJ	LJ KUN
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
<i>M. avium</i> -kompleks	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. gordonae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M.</i> -arter (andre)	5	5	2	1	0	3	0
ALLE ISOLATER	388	308	76	284	56	183	15

### Ikke-luftvejsprøver

I en separat undersøgelse på et stort universitetshospital blev 803 ikke-luftvejsprøver undersøgt med BACTEC MYCO/F-Sputa-dyrkningsmediet, BACTEC 12B-dyrkningsmediet og konventionelt medium (Lowenstein-Jensen). Det samlede antal positive isolater af patogenene mycobakterier i undersøgelsen var 38. Ud af disse positive isolater blev 29 (76,3 %) isoleret i BACTEC 9000MB-systemet, 30 (78,9%) blev isoleret i BACTEC 460TB-systemet og 24 (63,2%) blev isoleret vha. konventionelle faste dyrkningsmedier (Lowenstein-Jensen). BACTEC 9000MB-systemet og faste medier isolerede tilsammen 89,5% af det samlede antal patogene isolater. Det samlede antal prøver (patogene og ikke-patogene mycobakterier) fordelte sig på følgende kilder: Mave (5,1%), andre sterile kropsvæsker end blod (17,9%), afføring (10,3%), hud/sårdræn (5,1%), væv (53,8%) og urin (7,7%). Følgende isolater blev dømt positive af BACTEC 9000MB-systemet ved brug af BACTEC MYCO/F-Sputa i denne kliniske undersøgelse. *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* og *M. bovis*. Den samlede forekomst af falske positive (instrumentpositive, udstryknings- og/eller videredykningsnegative) var 5,0%. Pga. variationen blandt de indsamlede og undersøgte prøver er der en signifikant forskel mellem den målte og den tidligere forekomst af falske positive i luftvejsprøver. Forekomsten af gennembrudskontaminering for normale, sterile prøver (dvs. væv og andre sterile kropsvæsker end blod) lå mellem 4,7% og 18,9%. Ikke-sterile prøver (dvs. maveprøve, afføring, urin, hudoverflade/sårdræn) lå mellem 8,2% og 73,9%. Den samlede gennembrudskontaminering lå på 14,9%.

**REFERENCER:** Se afsnittet "References" i den engelske tekst.

BD Diagnostics Teknisk service og support: skal De kontakte den lokale BD repræsentant.

## BD Frascos de Cultura BACTEC MYCO/F-Sputa Caldo de Carne de Middlebrook 7H9 Suplementado

Português

### UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Os meios de cultura BACTEC MYCO/F-Sputa (meio líquido Middlebrook 7H9 modificado com CO<sub>2</sub>), suplementados com o Suplemento/F BACTEC e com a mistura de antibióticos PANTA/F BACTEC quando for apropriado, são utilizados com o instrumento BACTEC da série fluorescente 9000MB como um procedimento qualitativo para a cultura *in vitro* e para o isolamento de micobactérias. As amostras admitidas para a utilização neste teste são: amostras clínicas descontaminadas e digeridas, bem como líquidos corporais estéreis, excepto o sangue.

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

Desde os meados dos anos 80 e da disseminação da epidemia de SIDA, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e outras micobactérias para além da tuberculose (MOTT), especialmente o complexo do *Mycobacterium avium* (MAC), têm vindo a ressurgir. 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.<sup>1</sup> Entre 1981 e 1987, a vigilância dos casos de SIDA indicou que 5,5% dos doentes com SIDA apresentavam infeções micobacterianas não tuberculosas disseminadas, por exemplo, o MAC. Em 1990, o aumento dos casos de infeções micobacterianas não tuberculosas disseminadas resultou numa incidência cumulativa de 7,6%.<sup>2</sup> 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. O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC) recomendou aos laboratórios que fossem efectuados 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.<sup>3</sup>

O Sistema 9000MB BACTEC foi concebido para a detecção rápida de micobactérias em amostras clínicas, excepto sangue. O sistema inclui um meio de cultura líquido (Frasco de Cultura MYCO/F-Sputa), um suplemento de crescimento (Suplemento/F) e um suplemento de antibióticos (PANTA/F BACTEC). O Suplemento/F BACTEC contém promotores do crescimento para as micobactérias e é igualmente utilizado para reconstituir o PANTA/F BACTEC. O PANTA/F BACTEC contém agentes antimicrobianos utilizados para suprimir o crescimento de microorganismos contaminantes ou da flora normal que possam ter sobrevivido ao processo de descontaminação, e é recomendado como suplemento em todas as amostras não estéreis. Cada frasco contém um sensor capaz de detectar diminuições no oxigénio dissolvido no meio, resultantes do metabolismo e do crescimento dos microorganismos. O sensor é monitorizado pelo instrumento relativamente ao aumento da fluorescência, o qual é proporcional à diminuição do conteúdo de oxigénio dissolvido. Uma leitura positiva indica a presença presuntiva de micobactérias viáveis no frasco. A detecção está limitada aos microorganismos que crescerão no meio.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

As amostras clínicas, excepto o sangue, são colhidas e processadas de acordo com os procedimentos padrão para o isolamento de micobactérias. As amostras processadas são inoculadas com uma agulha e seringa dentro de um frasco de cultura MYCO/F-Sputa BACTEC, o qual foi previamente suplementado com o Suplemento/F BACTEC e/ou o PANTA/F BACTEC, dependendo do tipo de amostra (consulte a secção do Procedimento). As informações do doente são introduzidas no computador do sistema, sendo atribuída uma posição ao frasco através do menu do código de barras no instrumento. O frasco é colocado dentro do Sistema 9000MB BACTEC e é submetido a uma incubação contínua a 37 °C, sendo o frasco agitado a cada dez minutos para obter um isolamento óptimo. A respiração dos microorganismos aeróbios viáveis existentes no frasco MYCO/F-Sputa origina uma diminuição detectável do oxigénio dentro desse frasco. A depleção do oxigénio dissolvido provoca um aumento na fluorescência do sensor do frasco. A cada dez minutos, cada um dos frascos de cultura é monitorizado pelo Sistema 9000MB BACTEC relativamente ao aumento da fluorescência. A análise da velocidade de diminuição do oxigénio dissolvido é utilizada para determinar se a cultura do frasco é positiva; ou seja, se a amostra testada contém organismos viáveis. Os frascos de cultura que se mantenham negativos durante um período mínimo de 42 dias (até 56 dias) e que não apresentem sinais visíveis de positividade são retirados do instrumento e esterilizados antes de serem eliminados.

## REAGENTES

Antes do processamento, os frascos de cultura MYCO/F-Sputa **BACTEC** contêm os seguintes ingredientes activos:

### Lista de Ingredientes

Água Processada. . . . .	40 mL	Sulfato de Amónia . . . . .	0,05% p/v
Base de Meio Líquido Middlebrook 7H9 . . . . .	0,47% p/v	Citrato de Amónia Férrico . . . . .	0,006% p/v
Hidrolisado de Caseína 0,10% p/v . . . . .	0,10% p/v	Polisorbato 80. . . . .	0,0025% p/v
Suplemento H . . . . .	0,30% p/v	Hemina . . . . .	0,0005% p/v
Glicerol. . . . .	0,10% p/v		

Todos os meios **BACTEC** são distribuídos com CO<sub>2</sub> adicionado. A composição pode ter sido ajustada para cumprir exigências de desempenho específicas.

Antes da inoculação de amostras do aparelho respiratório e de amostras não estéreis, deverá adicionar a cada frasco de 40 mL de meio MYCO/F-Sputa **BACTEC**, 2,0 mL de solução de Suplemento de Antibióticos **PANTA/F BACTEC** reconstituída com o Suplemento/F **BACTEC**. Antes da inoculação de líquidos corporais estéreis, excepto o sangue, cada frasco de 40 mL de meio MYCO/F-Sputa **BACTEC** deverá ser suplementado com 2,0 mL de Suplemento/F **BACTEC**. Para obter mais informações, consulte, os Folhetos Informativos do **PANTA/F BACTEC** (PP-102) e do Suplemento/F **BACTEC** (PP-103).

## ADVERTÊNCIAS

**Precauções:** Para uso diagnóstico *in vitro*.

Este Produto Contém Borracha Natural Desidratada.

**AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Cumpra as "Precauções Universais"<sup>4,5</sup> e as linhas de orientação da instituição, durante a manipulação e eliminação de materiais infecciosos.**

Para a preparação de colorações ácidas rápidas e para a cultura de amostras clínicas, é recomendada a adopção de práticas, bem como a utilização de equipamentos de contenção e instalações de Nível 2 de Segurança Biológica. Para as actividades que envolvam a propagação e a manipulação do *Mycobacterium tuberculosis* ou de espécies de *Mycobacterium* que tenham crescido em cultura, é exigida a adopção de práticas, bem como a utilização de equipamentos de contenção e instalações do Nível 3 de Segurança Biológica, conforme é recomendado pelo CDC.<sup>6</sup>

Antes de ser utilizado, cada frasco deve ser examinado relativamente a sinais de contaminação, tais como turvação, abaulamento ou depressão do septo, ou fugas. Em raros casos, o gargalo do frasco de vidro poderá estar rachado e partir-se durante a remoção da tampa de encaixe, ou durante a manipulação. De igual forma, um frasco poderá apresentar um enrolamento incompleto da tampa, conforme é visível quando o bordo na parte inferior da tampa não se encontra uniformemente enrolado por baixo do gargalo do frasco. Em ambos os casos, poderá ocorrer uma fuga ou o derrame do conteúdo do frasco, especialmente se o frasco for invertido. **NÃO UTILIZE** um frasco que apresente sinais de contaminação, danos ou enrolamento incompleto.

Para minimizar a possibilidade de fugas durante a inoculação da amostra dentro dos frascos de cultura, utilize uma seringa de tuberculina com uma agulha fixa de 25 gauge. Para evitar picadas de agulha acidentais, deverá utilizar uma técnica de inoculação com uma mão e um suporte de frasco apropriado. **NÃO devem ser utilizadas agulhas com um diâmetro superior a 20 gauge.** A utilização de agulhas com um diâmetro superior para a adição do suplemento, libertação da pressão ou para a realização de uma repicagem, poderá danificar permanentemente o septo do frasco e dar origem a fugas.

**Frascos de cultura positivos para repicagem ou coloração, etc.:** Antes da colheita de amostras, é necessário libertar o gás frequentemente produzido devido ao metabolismo microbiano. A colheita de amostras deverá ser efectuada numa câmara de segurança biológica e utilizando vestuário protector, incluindo luvas e máscaras. Consulte a secção do **PROCEDIMENTO** para obter mais informações sobre a repicagem.

Um frasco contaminado pode conter uma pressão positiva. Se for retirada uma amostra de um frasco contaminado, poderá ocorrer uma fuga de gás e/ou de meio de cultura contaminado, produzindo aerossóis perigosos. A contaminação do frasco pode não ser imediatamente aparente.

Antes de eliminar, esterilize todos os frascos MYCO/F-Sputa inoculados em autoclave.

## FRASCOS COM FUGAS OU PARTIDOS

Se ocorrerem fugas de um frasco inoculado, ou se este se partir acidentalmente, utilize o procedimento estabelecido no seu laboratório para lidar com derrames de micobactérias. No mínimo, devem ser utilizadas as "Precauções Universais". Recomenda-se a utilização de uma protecção respiratória aprovada. Qualquer frasco que apresente fugas mínimas confinadas ao septo e à tampa do frasco pode ser desinfectado topicamente utilizando um desinfectante micobactericida, seguido de álcool isopropílico a 70%. Se isto ocorrer dentro do instrumento, existe a possibilidade de exposição a aerossóis. Desligue o instrumento e feche imediatamente as portas. Esvazie a área afectada. Contacte a(s) Autoridade(s) de Segurança ou de Controlo de Infecções. Determine se é necessário desligar ou modificar os parâmetros das unidades de tratamento do ar na área afectada. Não regressar à área afectada até os potenciais aerossóis terem assentado ou sido removidos através de ventilação apropriada. A BD Diagnostics deverá ser notificada através do representante apropriado da BD na sua área. Foram publicadas pelo CDC<sup>8</sup> linhas orientadoras para o tratamento adequado de contaminações acidentais por micobactérias, resultantes da quebra de tubos de cultura ou de suspensões de meio líquido.

## INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

**Frascos de cultura MYCO/F-Sputa:** Armazene entre 2° e 25 °C, num local seco e **sem luz directa**.

**NÃO** utilize após o fim do prazo de validade.

**Suplemento de Antibióticos PANTA/F BACTEC:** Armazene o **PANTA/F BACTEC** não reconstituído entre 2 e 8 °C. Logo após a reconstituição, deverá ser utilizado imediatamente ou congelado entre -20 a -70 °C durante um período de até 6 meses. Depois de descongelar, **NÃO** volte a congelar. Proteger da luz. Evite o sobreaquecimento.

**NÃO** utilize após o fim do prazo de validade.

## PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

A expectoração ou outras amostras do aparelho respiratório devem ser digeridas, descontaminadas e concentradas, antes da inoculação dentro dos frascos de cultura MYCO/F-Sputa. É recomendado o método da N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio.<sup>5,7,8</sup> Como alternativa para o processamento da amostra, pode ser utilizado o Kit **MycoPrep BBL**. Não foram testados outros métodos de descontaminação em conjunto com o meio MYCO/F-Sputa. Após a centrifugação (≥ 3.000 x g, 15 min.), o sedimento deverá ser novamente suspenso em tampão fosfato estéril, pH 6,8.

O processamento de amostras que não tenham origem no aparelho respiratório, excepto o sangue, deverá ser efectuado de acordo com o Manual de Microbiologia Clínica,<sup>9</sup> CDC ou de acordo com o manual de procedimentos do seu laboratório.

## PROCEDIMENTO

**O meio MYCO/F-Sputa deve ser utilizado com um instrumento da série fluorescente 9000MB BACTEC.**

**Materiais Fornecidos:** Frascos de cultura MYCO/F-Sputa **BACTEC**, Suplemento de antibióticos **PANTA/F BACTEC** e Suplemento de Meios Suplemento/F **BACTEC**.

**Materiais Necessários mas Não Fornecidos:** Centrifuga; Câmara de Segurança Biológica; Autoclave; incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C, 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 vórtex; pipetas de distribuição estéreis; seringa de tuberculina estéril com agulha de 25 gauge; desinfectante micobactericida; álcool propílico a 70%; agár para micobactérias ou meio à base de ovo; meio líquido 7H9, soro fisiológico estéril; organismos de Controlo da Qualidade (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841 e *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478); microscópio e materiais para a coloração de lâminas.

## INOCULAÇÃO DOS FRASCOS DE CULTURA MYCO/F-SPUTA

1. Retire a tampa de encaixe do topo do frasco **BACTEC** e inspecione-o relativamente à existência de rachas, contaminação, turvação excessiva e abaulamento ou irregularidades do septo. Se for detectado algum defeito, **NÃO UTILIZAR**.
2. Rotule o frasco de cultura com a identificação da amostra.
3. Reconstitua o frasco **PANTA/F BACTEC** liofilizado com 10 mL de Suplemento/F **BACTEC**, utilizando uma seringa com uma ponta da marca **Luer-Lok**, com uma agulha de 25 gauge. **NÃO DEVEM** ser utilizadas agulhas com um diâmetro superior a 20 gauge. As agulhas com diâmetros superiores poderão danificar permanentemente o septo do frasco. Misture bem o conteúdo. Inspeccione visualmente o conteúdo do frasco para confirmar dissolução do Suplemento de Antibióticos **PANTA/F BACTEC**.
4. Para as amostras do aparelho respiratório e para as amostras não estéreis, os frascos com o meio MYCO/F-Sputa que vão ser inoculados deverão ser suplementados com 2,0 mL de solução **PANTA/F BACTEC** reconstituída. Os frascos com o suplemento deverão ser inoculados num período de duas horas depois de a solução **PANTA/F BACTEC** ter sido adicionada. Antes de inocular com a solução, limpe o septo com álcool isopropílico a 70%. Recomenda-se a utilização de uma seringa de tuberculina equipada com uma agulha de 25 gauge fixa. Para evitar picadas de agulha acidentais, deverá utilizar uma técnica de inoculação com uma mão e um suporte de frasco apropriado. Para as amostras de tecido ou outras amostras com partículas, é recomendada a utilização de uma agulha de diâmetro superior (20 a 22 gauge) e uma seringa com uma ponta da marca **Luer-Lok** ou semelhante.  
Para os líquidos corporais estéreis, excepto o sangue (por ex., líquido sinovial ou peritoneal), os frascos com o meio MYCO/F-Sputa deverão ser suplementados com 2,0 mL de Suplemento/F **BACTEC** antes de serem inoculados. Antes de inocular com o Suplemento/F **BACTEC**, limpe o septo com álcool isopropílico a 70%. Recomenda-se a utilização de uma seringa de tuberculina equipada com uma agulha de 25 gauge fixa. Para evitar picadas de agulha acidentais, deverá utilizar uma técnica de inoculação com uma mão e um suporte de frasco apropriado.
5. Injete, de forma asséptica, 0,5 mL de amostra processada em cada frasco, utilizando uma seringa de tuberculina com uma agulha de 25 gauge. A introdução e a remoção da agulha devem ser efectuadas com um movimento em linha recta, evitando quaisquer movimentos de lateralidade que possam danificar permanentemente o septo. Limpe o septo com um desinfetante micobactericida, seguido de álcool isopropílico a 70%. Os frascos inoculados devem ser colocados o mais rapidamente possível no Sistema 9000MB **BACTEC**, impreterivelmente no mesmo dia em que a amostra é descontaminada, processada e inoculada dentro dos frascos de cultura MYCO/F-Sputa **BACTEC**.  
Nesta fase, deverá ser inoculado um meio convencional, tal como o Lowenstein-Jensen ou o 7H10/7H11.
6. Os frascos introduzidos dentro do instrumento serão automaticamente testados durante o período de duração do protocolo do teste. Os frascos positivos serão identificados pelo Sistema 9000MB **BACTEC** (consulte o Manual do Utilizador do 9000MB **BACTEC**, MA-0092). O sensor no interior do frasco poderá não apresentar diferenças visíveis entre os frascos positivos e negativos; no entanto, o Sistema 9000MB **BACTEC** consegue detectar diferenças na fluorescência do sensor.
7. Deverá ser efectuada uma repicagem, seguida de um esfregão com coloração ácida rápida, a partir dos frascos positivos.  
Processamento de um frasco positivo detectado pelo instrumento:
  - a) Retire o frasco do instrumento.
  - b) Numa câmara de segurança biológica, ventile o frasco para equilibrar a pressão do frasco com a pressão atmosférica.
  - c) Inverta o frasco para misturar o conteúdo.
  - d) Retire uma alíquota do frasco (aprox. 0,1 mL) para as preparações coradas (colorações AFB e Gram).
  - e) Inspeccione o esfregão 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 no instrumento, AFB positivo, ID pendente.

**Se existirem outros microorganismos além de bacilos** corados pela coloração ácida rápida, descreva como: positivo no instrumento, AFB Negativo, Contaminado.

**Se não existirem microorganismos** nos esfregãos, volte a introduzir o frasco dentro do instrumento, como fosse um frasco negativo pendente, e deixe terminar o protocolo do teste. Nenhum resultado disponível.

As repicagens para os testes de identificação e de susceptibilidade a fármacos podem ser efectuadas utilizando líquido proveniente dos frascos de cultura MYCO/F-Sputa **BACTEC**.

**Repicagem e Re-introdução dos Frascos:** A repicagem deverá ser efectuada numa estante de segurança biológica e utilizando vestuário apropriado, incluindo luvas e máscaras. Antes de efectuar a repicagem, coloque o frasco em posição vertical e coloque uma compressa com álcool sobre o septo. Para libertar a pressão positiva que possa existir no frasco, a qual pode ser provocada pelo crescimento de contaminantes, introduza uma agulha estéril de 25 gauge (ou com diâmetro inferior), equipada com um filtro ou um tampão apropriado, através da compressa com álcool e do septo. A agulha deverá ser retirada após a libertação da pressão existente no frasco e antes da recolha da amostra do frasco para efectuar a repicagem. A introdução e a remoção da agulha devem ser efectuadas com um movimento em linha recta, evitando quaisquer movimentos de lateralidade que possam danificar permanentemente o septo. Para efectuar uma repicagem do frasco ventilado, inverta-o para misturar bem o conteúdo e introduza uma seringa nova, com uma agulha de 25 gauge, para retirar o meio de cultura para o processamento subsequente. **Não volte a colocar a tampa na agulha. Elimine as agulhas e as seringas para um recipiente de resíduos contaminados resistente a objectos cortantes.**

O utilizador poderá desejar que um frasco com um esfregão negativo seja novamente colocado no instrumento para que continue a ser monitorizado pelo protocolo do teste.

No fim do período de seis semanas de incubação, inspeccione visualmente todos os frascos negativos existentes no instrumento. Se o frasco apresentar sinais de positividade (isto é, se estiver turvo com possíveis colónias de micobactérias), deverá ser efectuada uma repicagem, uma coloração ácida rápida e o frasco deverá ser tratado como sendo presumivelmente positivo, desde que o resultado da coloração ácida rápida seja positivo. Se o frasco não apresentar sinais de positividade, deverá ser esterilizado antes de ser eliminado.

## CONTROLO DE QUALIDADE

Em cada caixa de meios de cultura, são fornecidos Certificados do Controlo de Qualidade.

Recomenda-se que cada nova remessa ou lote de meios de cultura MYCO/F-Sputa **BACTEC** seja testada com os organismos de controlo ATCC, identificados na tabela em baixo, como controlo positivo, e um frasco não inoculado como controlo negativo.

Organismo	Intervalo de Tempo até à Detecção (dias)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 a 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 a 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 a 12

Para preparar o frasco de controlo positivo:

1. Cultive o organismo no meio líquido 7H9.
2. Utilizando soro fisiológico estéril, prepare uma suspensão McFarland #1 ( $\approx 10^7$  UFC/mL) do organismo.
3. Dilua a suspensão para  $10^4$  UFC/mL, utilizando soro fisiológico estéril.
4. Inocule 1 mL desta suspensão dentro de um frasco de cultura MYCO/F-Sputa previamente suplementado com 2,0 mL de PANTA/F BACTEC reconstituído. **O inóculo de 1 mL destina-se a ser utilizado apenas para os organismos do Controlo de Qualidade.**

Os frascos de controlo positivo e negativo deverão ser passados pelo scanner e introduzidos dentro do instrumento, e em seguida testados. O frasco de controlo positivo deverá ser detectado pelo instrumento como positivo no intervalo de tempo referido na tabela anterior. O controlo negativo deverá permanecer negativo. Se, qualquer um destes frascos não utilize os meios até entrar em contacto com o representante local da BD.

Para obter informações sobre o controlo de qualidade para o Sistema 9000MB BACTEC, consulte o Manual do Utilizador do 9000MB BACTEC (MA-0092).

## RESULTADOS

A determinação da positividade da cultura de uma amostra é efectuada pelo Sistema 9000MB BACTEC, sendo confirmada por um esfregaço com coloração ácida rápida. Um resultado positivo indica a presença presuntiva de microorganismos viáveis no frasco.

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

### Contaminação

Deverá ter cuidado de forma a evitar a contaminação externa da amostra durante a colheita, digestão, descontaminação e inoculação dentro do frasco BACTEC. Devido à riqueza do meio e à natureza não selectiva da detecção do consumo de oxigénio pela fluorescência, poderá haver contaminação por sobreposição de crescimento.

Os procedimentos de digestão e de descontaminação deverão ser efectuados com cuidado, de forma a diminuir a contaminação pela sobreposição de crescimento de outros organismos além das micobactérias. Teste apenas os tipos de amostras indicados. Um frasco contaminado apresentará uma leitura positiva no instrumento, mas não indicará um resultado clinicamente relevante. Tal determinação deverá ser efectuada pelo utilizador com base em determinados factores tais como, o resultado do esfregaço com coloração ácida rápida, o tipo de organismo isolado, a ocorrência do mesmo organismo em múltiplas culturas, a história do doente, etc. (Consulte o Manual do Utilizador do 9000MB BACTEC, MA-0092 relativamente ao procedimento de repetição da descontaminação do frasco).

É recomendada a descontaminação com o método da N-acetil-L-cistena-hidróxido de sódio (NALC-NaOH). Não foram testados outros métodos de descontaminação em conjunto com o meio MYCO/F-Sputa BACTEC. As substâncias utilizadas para a digestão-descontaminação podem exercer efeitos prejudiciais sobre as micobactérias.

### Tipo de Amostra

Quando for apropriado, os frascos de cultura MYCO/F-Sputa BACTEC suplementados com o Suplemento/F BACTEC e com o PANTA/F BACTEC devem ser utilizados para a cultura e isolamento de amostras clínicas e de líquidos corporais estéreis, excepto o sangue, digeridos e descontaminados. O nível de detecção mínimo deste teste pode variar de acordo com as espécies de micobactérias presentes.

**NÃO UTILIZE** os frascos do meio de cultura MYCO/F-Sputa para o isolamento de micobactérias a partir de sangue.

Os líquidos pleurais podem conter glóbulos vermelhos e glóbulos brancos<sup>10</sup>, os quais possuem uma elevada taxa de metabolismo oxidativo, podendo provocar falsos positivos.

### Considerações Gerais

A detecção de espécies de micobactérias em amostras clínicas 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 e tratamentos anteriores, e do método de processamento. O cumprimento das instruções do procedimento é primordial para a optimização do isolamento de micobactérias. A contaminação com micobactérias saprófitas presentes na água corrente ou em outros reagentes e equipamento de laboratório pode dar origem a resultados falsos positivos.

A detecção óptima de isolados será obtida adicionando 0,5 mL de inóculo da amostra processada e ressuspendida a cada frasco. O rigor do protocolo de digestão e de descontaminação utilizado para processar a amostra também pode afectar o isolamento e período de tempo até à detecção.

As micobactérias podem variar na rapidez com que adquirem a coloração ácida, dependendo da estirpe, da idade da cultura e de outras variáveis. Todos os frascos positivos, seja por indicação do instrumento, seja por se apresentarem turvos no fim do protocolo do teste, devem ser submetidos a uma repicagem em meio selectivo e em meio não selectivo para micobactérias. O crescimento de outras espécies que não a das micobactérias poderá sobrepor-se ao crescimento das micobactérias presentes. Estes frascos de cultura devem ser novamente descontaminados e cultivados. (Consulte o Manual do Utilizador do 9000MB BACTEC, MA-0092, relativamente ao procedimento de repetição da descontaminação do frasco.)

A morfologia e pigmentação características das colónias podem ser determinadas apenas em meios sólidos. A partir de um frasco de MYCO/F-Sputa positivo, poderão ser efectuados outros testes de identificação para determinar a espécie da micobactéria.

Os frascos MYCO/F-Sputa BACTEC que pareçam positivos, podem conter uma ou mais espécies de micobactérias e/ou outras espécies além das micobactérias. Para identificar as micobactérias presentes é necessária uma repicagem em meio sólido, bem como a realização de procedimentos suplementares para identificar os organismos presentes. A consistência da morfologia microscópica no MYCO/F-Sputa BACTEC ainda não foi estabelecida.

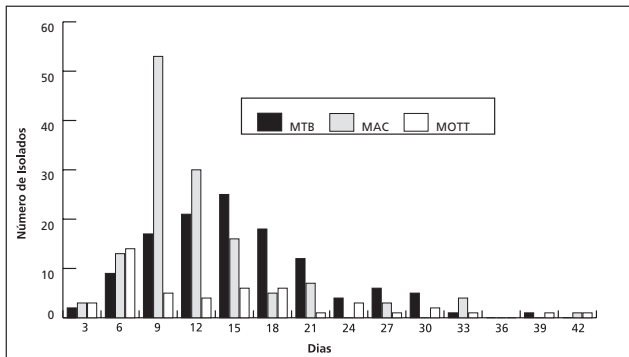
Os frascos MYCO/F-Sputa BACTEC são incubados a 37 °C, o que exclui, em princípio, o isolamento de micobactérias que necessitem de outras temperaturas de incubação (por ex., *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). O isolamento desses organismos necessita de métodos de cultura suplementares. Os organismos com exigências de crescimento especiais (por ex., *M. haemophilum*) poderão não ser isolados no MYCO/F-Sputa BACTEC quando forem incubados à temperatura apropriada. Durante os estudos internos e/ou ensaios clínicos efectuados no Sistema 9000MB BACTEC com o MYCO/F-Sputa BACTEC, foram detectados como positivos os seguintes isolados: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium xenopi*.

A utilização do Suplemento de Antibióticos PANTA/F BACTEC, apesar de ser necessária para todas as amostras não estéreis, pode exercer efeitos inibidores sobre algumas micobactérias.

Durante os estudos clínicos, não foram efectuadas repicagens terminais como rotina. Portanto, nesta fase não é possível determinar uma taxa real de falsos negativos, definidos como frascos de cultura MYCO/F-Sputa que permaneceram negativos ao longo do período de incubação de seis semanas, tendo posteriormente ocorrido o crescimento de uma micobactéria nas repicagens efectuadas.

## RESULTADOS ESPERADOS

Em ensaios clínicos, a distribuição da frequência dos tempos de isolamento para as amostras do aparelho respiratório positivas no Sistema 9000MB BACTEC, encontra-se ilustrada na figura seguinte.



## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### Amostras do Aparelho Respiratório

O Sistema 9000MB BACTEC foi avaliado em quatro locais clínicos, incluindo laboratórios de saúde pública, assim como hospitais de grandes dimensões com serviço de urgência, em diversas áreas geográficas. As populações locais incluíram doentes infectados com o VIH, doentes imunodeprimidos e doentes transplantados. O Sistema 9000MB BACTEC foi comparado com o sistema radiométrico 460TB BACTEC, assim como com meios de crescimento sólidos convencionais, para o isolamento e detecção de micobactérias em amostras do aparelho respiratório. Durante os ensaios, foram testadas um total de 3135 amostras do aparelho respiratório. O número total de isolados positivos para micobactérias patogénicas detectados no estudo foi de 348. Destes resultados positivos, 292 (84%) foram isolados no Sistema 9000MB BACTEC, 260 (75%) foram isolados no sistema radiométrico 460TB BACTEC e 178 (51%) foram isolados utilizando meios sólidos (Lowenstein-Jensen). Em conjunto, o Sistema 9000MB BACTEC e os meios sólidos isolaram 89,6% do total de isolados patogénicos. Para as MOTT\* ("Mycobacteria Other Than Tuberculosis" - Outras Micobactérias além da Tuberculose) não patogénicas, o número total de isolados positivos detectados no estudo foi de 40. Destes resultados positivos, 16 (40%) foram isolados no Sistema 9000MB BACTEC, 24 (60%) foram isolados no sistema radiométrico 460TB BACTEC e cinco (13%) foram isolados em meios sólidos. Em conjunto, o Sistema 9000MB BACTEC e os meios sólidos isolaram 50% do total das MOTT não patogénicas.

(\*As MOTT não patogénicas incluíram a *M. goodnae*, *M. abscessus*, *M. terrae*.)

O Sistema 9000MB BACTEC não detectou 1,8% dos isolados patogénicos que haviam sido detectados em um ou mais sistemas de referência (460TB BACTEC 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). A utilização de um segundo meio, conforme recomendado, aumentará a probabilidade de isolamento de micobactérias. O Sistema 9000MB BACTEC demonstrou uma taxa de falsos positivos de 1,5% (positivo no instrumento, negativo no esfregaço e/ou na repicagem). A taxa global de contaminação por sobreposição de crescimento para o Sistema 9000MB BACTEC foi de 6,5%.

### Resumo da detecção de isolados do Aparelho Respiratório no Sistema 9000MB BACTEC, durante os ensaios clínicos

Espécies Isoladas	Samlet Isolado	SAMLET 9000MB	9000MB APENAS	SAMLET 460TB	460TB APENAS	SAMLET LJ	LJ APENAS
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
Complexo <i>M. avium</i>	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. goodnae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
género <i>M.</i> (outras)	5	5	2	1	0	3	0
<b>TOTAL DE ISOLADOS</b>	<b>388</b>	<b>308</b>	<b>76</b>	<b>284</b>	<b>56</b>	<b>183</b>	<b>15</b>

### Amostras não Provenientes do Aparelho Respiratório

Num estudo separado, efectuado num grande hospital universitário, 803 amostras não provenientes do aparelho respiratório foram testadas com o meio de cultura MYCO/F-Sputa BACTEC, com o meio de cultura 12B BACTEC e com um meio convencional (Lowenstein-Jensen). O número total de isolados positivos de micobactérias patogénicas detectados no estudo foi de 38. Destes isolados positivos, 29 (76,3%) foram isolados no Sistema 9000MB BACTEC, 30 (78,9%) foram isolados no sistema radiométrico 460TB BACTEC e 24 (63,2%) foram isolados com o meio convencional (Lowenstein-Jensen). Em conjunto, o Sistema 9000MB BACTEC e os meios sólidos isolaram 89,5% do total de isolados patogénicos. O total de amostras positivas (micobactérias patogénicas e não patogénicas) foi distribuído entre as seguintes origens: gástrica (5,1%), líquidos corporais estéreis, excepto sangue (17,9%), fezes (10,3%), pele superficial/exsudado de feridas (5,1%), tecido (53,8%) e urina (7,7%). Durante este ensaio clínico efectuado no Sistema 9000MB BACTEC com o MYCO/F-Sputa, foram detectados como positivos os seguintes isolados: *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. bovis*. A taxa global de falsos positivos (positivos no instrumento, negativos no esfregaço e/ou repicagem) foi de 5,0%. Devido à variedade das amostras colhidas e testadas, a taxa de falsos positivos diferiu significativamente da taxa anteriormente referida para as amostras do aparelho respiratório. A taxa de contaminação por sobreposição de crescimento para as amostras normalmente estéreis (ou seja, tecidos e líquidos corporais estéreis, excepto sangue) variou entre 4,7% e 18,9%; para as amostras não estéreis (ou seja, gástrica, fezes, urina, pele superficial/exsudado de feridas) variou entre 8,2% e 73,9%. A taxa global de contaminação por sobreposição de crescimento foi de 14,9%.

**BIBLIOGRAFIA:** Consulte "Referências" no texto em Inglês.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD.

# BD MYCO/F-Sputa odlingsflaskor

## Middlebrook 7H9 tillägs buljong

Svenska

### ANVÄNDNINGSMRÅDE

**BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsmedier** (modifierad Middlebrook 7H9-buljong med CO<sub>2</sub>) med tillsats av **BACTEC Supplement/F** och **BACTEC PANTA/F** antibiotikablandning används när så är lämpligt tillsammans med **BACTEC** instrument ur fluorescensinstrumentserien 9000MB, för kvalitativ *in vitro*-odling och påvisning av mykobakterier. Prover som kan användas utgörs av enzymbehandlade, dekontaminerade kliniska prover och sterila kroppsvätskor förutom blod.

### SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Sedan mitten av 1980-talet och spridningen av AIDS-epidemin, är *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) och andra mykobakterier än tuberculosis (MOTT), i synnerhet *Mycobacterium avium*-komplex (MAC), åter på frammarsch. Från 1985 till 1992 ökade antalet rapporterade MTB-fall med 18%. Tuberkulos dödar fortfarande cirka 3 miljoner människor per år världen över, och leder därmed som dödsorsakande infektionssjukdom.<sup>1</sup> Mellan 1981 och 1987 hade 5,5% av AIDS-patienterna disseminerade, icke-tuberkulösa mykobakterieinfektioner såsom MAC, enligt AIDS-fallrapportering. Vid 1990 hade ökningen av fallen med disseminerade icke-tuberkulösa mykobakterieinfektioner resulterat i en kumulativ incidens på 7,6%.<sup>2</sup> Förutom återkomsten av MTB, har även multiäkemedelsresistent MTB (MDR-TB), givit anledning till ökad oro. Laboratoriebetingade förseningar vad gäller odling, identifiering och rapportering av dessa MDR-TB-fall har åtminstone delvis bidragit till sjukdomens spridning.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) rekommenderar alla laboratorier att göra varje ansträngning att använda de snabbaste metoder som finns tillgängliga för diagnostisk mykobakterietestning. Dessa rekommendationer innefattar användning av både vätskemedium och fast medium vid odling av mykobakterier.<sup>3</sup>

**BACTEC 9000MB**-systemet är konstruerat för snabb detektion av mykobakterier i kliniska prover förutom blod. Systemet inkluderar ett odlingsmedium i vätskeform (MYCO/F-Sputa odlingsflaska), en tillväxttillsats (Supplement/F) och en antibiotikatillsats (**BACTEC PANTA/F**). **BACTEC Supplement/F** innehåller tillväxtfrämjande faktorer för mykobakterier och används även för rekonstituering av **BACTEC PANTA/F**. **BACTEC PANTA/F** innehåller antimikrobiella substanser som används för att undertrycka växt av kontaminerande mikroorganismer eller normalflora som kan överleva dekontamineringsbehandlingen, och rekommenderas som tillägg till alla osterila prover. Varje flaska innehåller en sensor som kan detektera minskningar i koncentrationen löst oxygen i mediet som resultat av mikroorganismernas metabolism och tillväxt. Sensorn kontrolleras av instrumentet för ökad fluorescens, vilken är proportionell mot minskningen av halten löst oxygen. En positiv avläsning indikerar att flaskan kan innehålla viabla mykobakterier. Detektionsmöjligheten begränsas till sådana mikroorganismer som kan växa i ett visst slags medium.

### FUNKTIONSPRINCIPER

Kliniska prover förutom blod tas och behandlas enligt standardiserat förfarande för påvisning av mykobakterier. Behandlade prover ympas med en nål och sprutas på en **BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsflaska** som har tillsatts **BACTEC Supplement/F** och/eller **BACTEC PANTA/F** beroende på typ av prov (se Förfarande). Patientdata skrivs in i systemets dator och flaskan tilldelas en station med hjälp av streckkodsmeny på instrumentet. Flaskan sätts in i **BACTEC 9000MB**-systemet, inkuberas kontinuerligt vid 37 °C och skakas var tionde minut, för maximal påvisningsmöjlighet. Celländning hos viabla aeroba mikroorganismer i en MYCO/F-Sputa-flaska resulterar i en nettominskning av oxygenen i flaskan. En ökning av flasksensorns fluorescens orsakas av minskat löst oxygen. Varje odlingsflaska kontrolleras av **BACTEC 9000MB**-systemet var tionde minut för ökad fluorescens. Analys av halten löst oxygen görs för fastställande av om flaskan är odlingspositiv, dvs. om provet innehåller viabla organismer. Odlingsflaskor som fortfarande är negativa efter minst 42 dagar (upp till 56 dagar) och som inte visar några tecken på positiv odling vid okulärbesiktning, avlägsnas från instrumentet och steriliseras innan de bortskaffas.

### REAGENSER

**BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsflaska** innehåller följande aktiva beståndsdelar före användning:

#### Ingredienser

Behandlat vatten	..... 40 mL	Ammoniumsulfat	..... 0,05% v/v
7H9 Middlebrook-buljongbas	..... 0,47% v/v	Ferriammoniumcitrat	..... 0,006% v/v
Kaseinydrolysat	..... 0,10% v/v	Polysorbit 80	..... 0,0025% v/v
Supplement H	..... 0,30% v/v	Hemin	..... 0,0005% v/v
Glycerol	..... 0,10% v/v		

Alla **BACTEC**-medier dispensereras med tillsats av CO<sub>2</sub>. Sammansättningen kan ha justerats för att uppfylla specifika funktionskrav.

Före ympning av luftvägsprover och andra osterila prover måste 2,0 mL **BACTEC PANTA/F**-antibiotikatillsats som rekonstituerats med **BACTEC Supplement/F** tillsättas till varje 40 mL **BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsflaska**. Före ympning av steril kroppsvätska förutom blod måste 2,0 mL **BACTEC Supplement/F** tillsättas till varje 40 mL **BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsflaska**. Se förpackningsinlagorna för **BACTEC PANTA/F** (PP-102) och **BACTEC Supplement/F** (PP-103) för ytterligare information.

### VARNINGAR

**Försiktighetsbeaktanden:** För *in vitro*-diagnostik.

Denna produkt innehåller torr naturgummi.

**POTENTIELLT INFEKTIÖST PROV.** Iakttag "Generella försiktighetsbeaktanden"<sup>4,5</sup> och institutionens riktlinjer avseende hantering och bortskaffning av infektiöst material.

Förfaranden enligt biosäkerhetsnivå 2 och spridningsskyddande utrustning och anläggningar rekommenderas för beredning av färgning för syrafasta stavar och odling av kliniska prover. För aktiviteter som innefattar propagation och hantering av *Mycobacterium tuberculosis* eller *Mycobacterium*-arter som odlats på medium krävs enligt CDC:s rekommendationer förfaranden enligt biosäkerhetsnivå 3 och spridningsskyddande utrustning och anläggningar.<sup>6</sup>

Före användning skall varje flaska undersökas för tecken på kontamination såsom grumlighet, buktande eller indraget membran eller läckage. I sällsynta fall kan sprickor ha uppstått i flaskhalsen av glas och halsen kan gå sönder när löset dras av eller under hantering. Dessutom kan det inträffa att flaskans kapsyl inte är ordentligt hopklämd, vilket ses av ett metallkanten längst ned på kapsylen inte är jämnt inrullad under flaskhalsen. I båda fallen kan flaskans innehåll läcka eller spillas ut, speciellt om man vänder upp och ned på flaskan. En flaska som uppvisar tecken på kontamination, skada eller ofullständigt hopklämd kapsyl **FAR EJ** användas.

För att minimera risken för läckage vid ympning av prov på odlingsflaskan skall en tuberkulinspruta med en permanent fastsatt nål, 25 G, användas. För att undvika accidentella nålstick bör enhandsteknik och lämplig flaskhållare användas vid inokulation. **Nålar grövre än 20 G FAR EJ användas.** Vid tillsättning av tillsatser, tryckavlastning eller fortsatt odling kan användning av grövre nålar medföra permanent skada på flaskmembranet och orsaka läckage.

**Positiva odlingsflaskor för fortsatt odling eller färgning, etc.:** Före provtagning är det nödvändigt att släppa ut gas som ofta ansamlas på grund av den mikrobiella metabolismen. Provtagning måste utföras i biologiskt säkerhetsskåp och lämplig skyddsklädsel, inklusive handskar och munskydd, skall bäras. Se avsnittet **FÖRFARANDE** för ytterligare information om fortsatt odling.

I en kontaminerad flaska kan det finnas övertryck. Vid provtagning från en kontaminerad flaska, kan gas och/eller kontaminerat odlingsmedium frigöras från flaskan med farlig aerosolbildning som följd. Flaskkontamination är inte säkert tydligt synlig.

Innan de kasseras skall alla inokulerade MYCO/F-Sputa-flaskor steriliseras i autoklav.

## LÄCKANDE ELLER SKADADE FLASKOR

Om en inkulerad flaska läcker eller går sönder, skall på laboratoriet vedertagna åtgärder för spill av mykobakterier vidtas. De i "Generella försiktighetsbeaktanden" beskrivna åtgärderna är minimikrav. Det rekommenderas att använda något godkänt andningskydd. En flaska som uppvisar ett minimalt läckage begränsat till membranet och kapsylen, kan ydesinficeras med användning av mykobakteriedödande desinfektionsmedel, efterföljt av 70%-ig isopropylalkohol. Om läckage sker inuti instrumentet föreligger risk för exponering för aerosol. Slå av instrumentet och stäng dörrarna omedelbart. Utrym det berörda området. Kontakta säkerhets- och infektionskontrollpersonalen på din arbetsplats. Avgör om det är nödvändigt att slå av eller modifiera inställningarna på den ventilationsutrustning som försörjer det berörda området. Återvänd ej till området förrän all eventuell aerosol har sjunkit eller avlägsnats genom lämplig ventilation. BD Diagnostics skall informeras genom uppringning av närmaste BD-representant. CDC har utfärdat riktlinjer för korrekta åtgärder vid accidentell mykobakteriekontamination orsakad av skadade odlingsflaskor eller buljonguspensioner.<sup>6</sup>

## FÖRVARINGSANVISNINGAR

**MYCO/F-Sputa odlingsflaskor:** Förvaras vid 2° – 25 °C, på torr plats och skyddade från direkt ljus.

**FAR EJ** användas efter utgångsdatum.

**BACTEC PANTA/F-antibiotik tillsats:** Icke rekonstituerad **BACTEC PANTA/F** skall förvaras vid 2 – 8 °C. Efter rekonstituering skall produkten användas omedelbart eller förvaras fryst vid -20 till -70 °C i upp till sex månader. **FAR EJ** återfrysas efter upptining. Skyddas mot ljus. Överhetning skall undvikas.

**FAR EJ** användas efter utgångsdatum.

## PROVBEHANDLING

Sputum och andra prover från luftvägarna måste enzymbehandlas, dekontamineras och koncentreras innan de ympas på MYCO/F-Sputa odlingsflaskor. Användning av N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid-metoden rekommenderas.<sup>6,7,8</sup> Alternativt kan **BBL MycoPrep**-sats användas för behandling av provet. Andra dekontamineringsmetoder har inte testats tillsammans med MYCO/F-Sputa odlingsmedium. Efter centrifugering (≥ 3 000 x g, 15 min) skall sedimentet resuspenderas i steril fosfatbuffert, pH 6,8.

Behandling av icke-luftvägsprover förutom blod bör utföras i enlighet med Clinical Microbiology Handbook,<sup>9</sup> CDC Manual, eller enligt föreskrifter i det enskilda laboratoriets metodbok.

## FÖRFARANDE

**MYCO/F-Sputa odlingsmedium** måste användas tillsammans med fluorescensinstrument ur **BACTEC 9000MB-serien**.

**Tillhandahållna material:** **BACTEC** MYCO/F-Sputa odlingsflaskor, **BACTEC PANTA/F**-antibiotik tillsats och **BACTEC** Supplement/F mediumtillsats.

**Material som krävs men ej medföljer:** Centrifug; biologiskt säkerhetsskåp; autoklav; CO<sub>2</sub>-inkubator, 37 °C, **Falcon** 50 mL centrifugeringsror; 4%-ig natriumhydroxid; 2,9%-ig natriumcitratlösning; N-acetyl-L-cystein-pulver; fosfatbuffert pH 6,8, vortexblandare; sterila överföringspipetter; steril tuberkulinspruta med nål 25 G; mykobakteriedödande desinfektionsmedel; 70%-ig isopropylalkohol; mykobakterieagar eller äggbaserat medium; 7H9-buljong, steril fysiologisk koksaltlösning; organismer för kvalitetskontroll (*Mycobacterium tuberculosis*, ATCC 27294; *Mycobacterium fortuitum*, ATCC 6841; och *Mycobacterium kansasii*, ATCC 12478); mikroskop och material för färgning av preparat.

## INOKULATION AV MYCO/F-SPUTA ODLINGSFLASKOR

1. Dra av locket från **BACTEC**-flaskan och inspektera flaskan för sprickor, kontamination, uttalad grumlighet och buktande eller indraget membran. Flaskan **FAR EJ** användas om någon defekt noteras.
2. Märk odlingsflaskan med provdata.
3. Använd en spruta med en **Luer-Lok**-kona och en 25 G nål och rekonstituera den lyofiliserade **BACTEC PANTA/F**-flaskan med 10 mL **BACTEC** Supplement/F. Nälar grövre än 20 G **FAR EJ** användas. Grövre nålar kan orsaka permanent skada på flaskans membran. Blanda innehållet väl. Inspektera flaskans innehåll och säkerställ att **BACTEC PANTA/F**-antibiotiktillsatsen är fullständigt upplöst.
4. För luftvägsprover och osterila prover måste 2,0 mL av den rekonstituerade **BACTEC PANTA/F**-lösningen tillsättas till de MYCO-F-Sputa odlingsflaskor som skall inokuleras. Flaskor med tillsats skall inokuleras inom två timmar efter tillsättningen av **BACTEC PANTA/F**-lösningen. Före tillsättningen av **BACTEC PANTA/F**-lösning skall membranet torkas av med 70%-ig isopropylalkohol. Det rekommenderas att använda en tuberkulinspruta med ej avtagbar nål, 25 G. För att undvika accidentella nålstick bör enhandsteknik och lämplig flaskhållare användas vid inokulation. För vävnadsprover eller andra fasta prover rekommenderas användning av en grövre nål, (20 – 22 G) och en spruta med **Luer-Lok**- eller motsvarande typ av kona. För sterila kroppsvätskor förutom blod (såsom synovial- och peritonealvätska), måste 2,0 mL **BACTEC** Supplement/F tillsättas till flaskorna med **BACTEC** MYCO/F-Sputa odlingsmedium före inokulation. Före tillsättningen av **BACTEC** Supplement/F skall membranet torkas av med 70%-ig isopropylalkohol. Det rekommenderas att använda en tuberkulinspruta med ej avtagbar nål, 25 G. För att undvika accidentella nålstick bör enhandsteknik och lämplig flaskhållare användas vid inokulationen.
5. Injicera aseptiskt 0,5 mL behandlat prov per flaska med användning av en tuberkulinspruta med en 25 G nål. Nålen bör föras in och dras ut rakt; undvik rörelser i sidled eftersom detta kan skada membranet. Torka av membranet med mykobakteriedödande desinfektionsmedel, efterföljt av 70%-ig isopropylalkohol. Inokulerade flaskor bör sättas in i **BACTEC** 9000MB-system så snart som möjligt, och åtminstone samma dag som provet dekontamineras, behandlas och ympas på **BACTEC** MYCO/F-Sputa odlingsflaskorna. Vid denna tidpunkt bör konventionella medier såsom Lowenstein-Jensen eller 7H10/7H11 inokuleras.
6. De flaskor som sätts in i instrumentet testas automatiskt under hela testprotokollperioden. Positiva flaskor identifieras av **BACTEC** 9000MB-systemet (se bruksanvisningen för **BACTEC** 9000MB, MA-0092). Sensorerna i positiva respektive negativa flaskor uppvisar inte säkert några synliga skillnader; en skillnad i fluorescens kan dock detekteras av **BACTEC** 9000MB-systemet.
7. Positiva flaskor bör genomgå fortsatt odling och ett utstryk för syrafasta stavar beredas.

Behandling av en instrumentpositiv flaska:

- a) Avlägsna flaskan från instrumentet.
- b) Lufta flaskan i ett biologiskt säkerhetsskåp så att trycket i flaskan ekvibreras med atmosfärstrycket.
- c) Vänd upp och ned på flaskan så att innehållet blandas.
- d) Ta ut en allkvot ur flaskan (ca 0,1 mL) för beredning av färgade preparat (AFB- och Gram-färgning).
- e) Inspektera utstryket och preparaten. Lämna inte preliminärsvaret förrän preparatet med färgning för syrafasta stavar har bedömts.

**Om AFB är positiv**, utförs fortsatt odling på fasta medier och resultatet rapporteras som: instrumentpositiv, AFB-positiv, identifiering pågår.

**Om andra mikroorganismer än syrafasta bakterier** föreligger rapporteras resultatet som: instrumentpositiv, AFB-negativ, kontaminerad.

**Om inga mikroorganismer** upptäckts i utstryken, sätts flaskan in igen i instrumentet som en pågående negativ flaska och testprotokollet fullföres. Inga rapporterbara resultat.

Fortsatta odlingar för identifiering samt resistensbestämning kan utföras med användning av vätska från **BACTEC** MYCO/F-Sputa odlingsflaskor.

**Fortsatt odling och återinsättning av flaska:** Fortsatt odling måste utföras i biologiskt säkerhetsskåp och lämplig skyddsklädes, inklusive handskar och munskydd, skall bäras. Innan fortsatt odling utförs skall flaskan ställas upprätt och en alkoholtork läggs över membranet. För att avlasta eventuellt övertryck i flaskan, vilket kan orsakas av växt av kontaminanter, skall en steril nål, 25 G (eller finare), försedd med lämpligt filter eller kompress stäckas genom alkoholtorken och membranet. Nålen bör avlägsnas efter att trycket har avlastats och innan prov tas från flaskan för fortsatt odling. Nålen bör föras in och dras ut rakt; undvik vridrörelser eftersom detta kan skada membranet. För fortsatt odling av den luftade flaskan vänds flaskan först så att innehållet blandas väl, och en ny



injektionsspruta med en 25 G nål sticks in och odlingsmedium tas för fortsatt behandling. **Sätt inte på nålskyddet på nålen igen. Kasta nålar och sprutor i en sticksäker behållare för biologiskt riskavfall.**

Användaren kan om så önskas sätta tillbaka en flaska med negativt utstryk i instrumentet för fortsatta kontroller under testprotokollperioden.

Efter sex veckors inkubering skall samtliga instrumentnegativa flaskor okulärbesiktigas. Om flaskan förefaller positiv vid inspektion (dvs. grumlig med möjliga mykobakterieklumpar) skall den genomgå fortsatt odling och färgning för syrafasta stavar samt behandlas som presumivt positiv under förutsättning att den syrafasta färgningen är positiv. Om flaskan inte uppvisar några tecken på att den är positiv skall den steriliseras före bortskaffning.

## KVALITETSKONTROLL

Kvalitetskontrollbevis medföljer varje låda odlingsmedier.

Det rekommenderas att varje ny försändelse eller nytt parti **BACTEC MYCO-F-Sputa** odlingsmedier testas med de ATCC-kontrollorganismer som anges i nedanstående tabell som positiv kontroll och en inokulerad flaska som negativ kontroll.

Organism	Intervall för tid-till-detektion (dygn)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , H37Rv, ATCC 27294	8 till 12
<i>Mycobacterium fortuitum</i> , ATCC 6841	1 till 3
<i>Mycobacterium kansasii</i> , ATCC 12478	6 till 12

Beredning av positiv kontrollflaska:

- Odla organismen i 7H9-buljong.
- Bered en McFarland nr. 1-suspension ( $\approx 10^7$  cfu/mL) av organismen med steril fysiologisk koksallösning.
- Späd suspensionen med steril fysiologisk koksallösning till  $10^4$  cfu/mL.
- Ympa 1 mL av denna suspension på en MYCO/F-Sputa odlingsflaska som tillsatts 2,0 mL rekonstituerad **BACTEC PANTA/F**. Inokulat på 1 mL skall endast användas för organismer för kvalitetskontroll.

De positiva och negativa kontrollflaskorna skannas in i instrumentet och testas. Den positiva kontrollflaskan bör avläsas som instrumentpositiv inom det tidsintervall som anges i ovanstående tabell. Den negativa kontrollen bör förbli negativ. Om någon av dessa flaskor inte ger förväntat resultat, får odlingsmedierna ej användas förrän närmaste BD-representant kontaktats.

För information om kvalitetskontroll av **BACTEC 9000MB**-systemet hänvisas till bruksanvisningen för **BACTEC 9000MB (MA-0092)**.

## RESULTAT

Ett odlingspositivt prov detekteras av **BACTEC 9000MB**-systemet och bekräffas via ett utstryk för syrafasta stavar. Ett positivt resultat indikerar att flaskan kan innehålla viabla mikroorganismer.

## METODENS BEGRÄNSNINGAR

### Kontamination

Försiktighet skall iakttagas så att extern kontamination av provet under provtagning, enzymbehandling och ympning på **BACTEC**-flaskan förhindras. På grund av det näringsrika mediet och oselektiviteten hos fluorescensdetektion av oxygenkonsumtion, kan kontamination slå igenom. Enzymbehandling och dekontamineringsförfaranden måste utföras noggrant så att genomslag av icke-mykobakteriella organismer reduceras. Testa endast icke-deklarerade protyper. En kontaminerad flaska kan ge en positiv instrumentavläsning men detta indikerar inte ett kliniskt relevant resultat. Användaren måste avgöra huruvida provet är kontaminerat eller ej, på grundval av sådana faktorer som resultatet från utstryk för syrafasta stavar, typ av påvisad organism, uppträdande av samma organism i flera odlingar, patientens anamnes, etc. (Se bruksanvisningen för **BACTEC 9000MB, MA-0092**, för beskrivning av förfarandet vid dekontaminering av flaskor.)

Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid (NALC-NaOH)-metoden rekommenderas. Andra dekontamineringsmetoder har inte testats för **BACTEC MYCO/F-Sputa** odlingsmedier. Enzymer-dekontaminanter kan utöva skadliga effekter på mykobakterier.

### Provtyp

**BACTEC MYCO/F-Sputa** odlingsflaskor med tillsats av **BACTEC Supplement/F** och **BACTEC PANTA/F**, är avsedda att användas för odling och påvisning av bakterier i enzymbehandlade och dekontaminerade kliniska prover och sterila kroppsvätskor med undantag av blod, när så är lämpligt. Detta tests lägsta detektionsnivå kan variera beroende på de befintliga mykobakteriearterna.

Odlingsflaskor med **MYCO/F-Sputa** odlingsmedium **SKALL EJ** användas för påvisning av mykobakterier i blod.

Pleuravätska kan innehålla röda och vita blodkroppar<sup>10</sup> som har hög oxidativ metabolism, vilket kan resultera i falskt positiva värden.

### Allmänna kommentarer

Detektion av mykobakteriearter i kliniska prover är beroende av antalet organismer i provet, provtagningsmetod, och sådana patientfaktorer som symtom, tidigare behandling och provbehandling. För optimala möjligheter till påvisning av mykobakterier är det av avgörande betydelse att alla anvisningar följs. Kontamination av saprofytiska mykobakterier i ledningsvattnet eller andra laboratoriereagenser och -utrustning kan ge upphov till falskt positiva resultat.

Optimal påvisning av isolat uppnås genom tillsats av 0,5 mL behandlat och resuspenderat provinokulat till varje flaska. Enzymbehandlingens och dekontamineringsförfarandets omfattning vid provbehandling kan också påverka påvisningsmöjligheten och tid-till-detektion.

Mykobakterier kan variera i syrafasthet beroende på stam, odlingsålder och andra variabler. Alla flaskor som klassas som positiva, antingen genom instrumentdetektion eller på grundval av grumligt utseende i slutet av testprotokollperioden, bör genomgå fortsatt odling i både selektiva och icke-selektiva mykobakteriemedier. Överväxt av icke-mykobakteriella arter över befintliga mykobakterier kan förekomma. Dessa odlingsflaskor bör dekontamineras på nytt och omdodas. (Se bruksanvisningen för **BACTEC 9000MB, MA-0092**, för beskrivning av förnyad dekontaminering av flaskan.)

Kolonimorfologi och pigmenteringsegenskaper kan endast bestämmas på fasta medier. Ytterligare tester för identifiering kan utföras för att bestämma mykobakteriearten i en positiv **MYCO/F-Sputa**-flaska.

**BACTEC MYCO/F-Sputa** odlingsflaskor som förefaller positiva kan innehålla en eller flera arter mykobakterier och/eller andra icke-mykobakteriearter. För identifiering av befintliga mykobakterier krävs fortsatt odling på fast medium och ytterligare förfaranden för identifiering av befintliga organismer. Permannensen i den mikroskopiska morfologi i **BACTEC MYCO/F-Sputa** har ej fastställts.

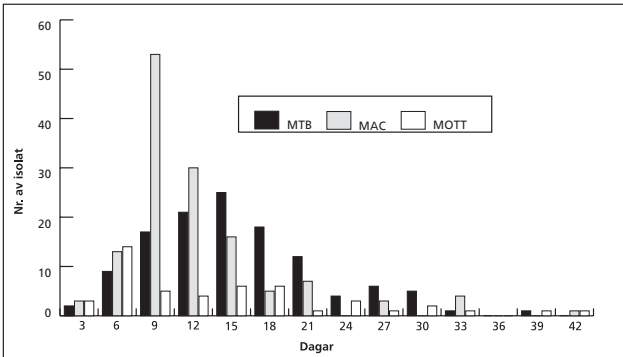
**BACTEC MYCO/F-Sputa** odlingsflaskor inkuberas vid 37 °C vilket möjliggör kan förhindra påvisning av mykobakterier som kräver andra inkubationstemperaturer (exempelvis *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). För påvisning av sådana organismer krävs ytterligare odlingsmetoder. Organismer med speciella tillväxtkrav (t. ex. *M. haemophilum*) är inte säkert påvisbara i **BACTEC MYCO/F-Sputa** vid inkubation vid lämplig temperatur. Följande isolat detekterades som positiva av **BACTEC 9000MB**-systemet, i både interna studier och/eller kliniska prövningar, vid användning av **BACTEC MYCO/F-Sputa**: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis* samt *Mycobacterium xenopi*.

Användning av **BACTEC PANTA/F**-antibiotikatillsats kan, även om det är nödvändigt för alla osterila prover, ha en hämmande effekt på vissa mykobakterier.

Avslutande fortsatta odlingar utfördes inte rutinmässigt under de kliniska studierna. Därför kan för närvarande ej fastställas den faktiska frekvensen falskt negativa resultat, definierad som **MYCO/F-Sputa** odlingsflaskor som förblivit negativa under hela inkubationsperioden på 6 veckor och som genomgått fortsatt odling med påvisad växt av mykobakteriella organismer.

## FÖRVÄNTADE RESULTAT

Frekvensdistributionen för detektionstider för enligt BACTEC 9000MB-systemet positiva luftvägsprover i kliniska försök illustreras i nedanstående figur.



## FUNKTIONSEGNSKAPER

### Prover från luftvägarna

BACTEC 9000MB-systemet utvärderades på fyra kliniska platser, vilka innefattade allmänna hälsovårdslaboratorier och stora akutsjukhus på geografiskt skilda orter. Patientpopulationerna på de olika platserna innefattade patienter infekterade med HIV, immunkomprometterade patienter och transplantationspatienter. BACTEC 9000MB-systemet jämfördes både med BACTEC 460TB-radiometrisystem och konventionella fasta odlingsmedier för detektion och påvisning av mykobakterier i luftvägsprover. Totalt 3135 luftvägsprover testades under prövningarna. Det totala antalet patogena mykobakteriepositiva isolat var 348. Av dessa positiva isolat påvisades 292 (84%) via BACTEC 9000MB-systemet, 260 (75%) påvisades via BACTEC 460TB-radiometrisystemet och 178 (51%) påvisades med användning av fasta medier (Lowenstein-Jensen). BACTEC 9000MB-systemet i kombination med fasta medier påvisade 89,6% av alla patogena isolat. För icke-patogena MOTT\* (mykobakterier förutom *M. tuberculosis*) var totalantalet positiva isolat som påvisades under studien 40. Av dessa positiva isolat påvisades 16 (40%) via BACTEC 9000MB-systemet, 24 (60%) påvisades via 460TB-radiometrisystemet och fem (13 %) påvisades med användning av fasta medier. BACTEC 9000MB-systemet i kombination med fasta medier påvisade 50% av alla icke-patogena MOTT.

(\*Icke-patogena MOTT inkluderade *M. gordonae*, *M. abscessus* och *M. terrae*.)

BACTEC 9000MB-systemet misslyckades med att påvisa 1,8% av de patogena isolat som påvisades i ett eller flera av referenssystemen (BACTEC 460TB eller konventionella fasta medier). Även om denna procentsats representerar potentiellt misslyckad påvisning, anger det inte faktisk falskt negativ bestämning (se avsnittet om begränsningar). Användning av ett ytterligare medium, såsom rekommenderas, ökar sannolikheten för påvisning av mykobakteriella organismer. BACTEC 9000MB-systemet uppvissade en falskt positiv frekvens på 1,5% (instrumentpositiv, men utstryk och/eller fortsatt odling negativ(a)). Den totala frekvensen för växt av kontaminerande organismer för BACTEC 9000MB-systemet var 6,5%.

### Sammanfattning av BACTEC 9000MB-systemets påvisning av isolat i luftvägsprover i de kliniska prövningarna

Isolerade arter	Summa isolat	TOTALT 9000MB	9000MB ENDAST	TOTALT 460TB	460TB ENDAST	TOTALT LJ	LJ ONLY
<i>M. tuberculosis</i>	146	123	14	126	13	93	3
<i>M. avium</i> complex	162	138	38	114	18	65	4
<i>M. kansasii</i>	10	10	0	9	0	9	0
<i>M. fortuitum</i>	18	11	7	6	3	7	4
<i>M. chelonae</i>	5	4	2	3	1	1	0
<i>M. simiae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	1	0	0
<i>M. gordonae</i>	34	14	10	23	19	2	1
<i>M. abscessus</i>	3	2	2	1	1	0	0
<i>M. terrae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. phlei</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. vaccae</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. arter</i> (andra)	5	5	2	1	0	3	0
SAMTLIGA ISOLAT	388	308	76	284	56	183	15

### Icke-luftvägsprover

I en separat studie vid ett stort universitetssjukhus testades 803 icke-luftvägsprover med BACTEC MYCO/F-Sputa odlingsmedium, BACTEC 12B odlingsmedium och konventionellt medium (Lowenstein-Jensen). Det totala antalet patogena mykobakteriepositiva isolat i studien var 38. Av dessa positiva isolat påvisades 29 (76,3%) via BACTEC 9000MB-systemet, 30 (78,9%) påvisades via BACTEC 460TB-systemet och 24 (63,2%) påvisades med användning av konventionellt medium (Lowenstein-Jensen). BACTEC 9000MB-systemet i kombination med fasta medier påvisade 89,5% av alla patogena isolat. Det totala antalet positiva prover (patogena och icke-patogena mykobakterier) var distribuerade över följande källor: gastriska (5,1%), sterila kroppsvätskor förutom blod (17,9%), faeces (10,3%), hudytas/särvätska (5,1%), vävnad (53,8%) och urin (7,7%). Följande isolat detekterades som positiva i BACTEC 9000MB-systemet vid användning av MYCO/F-Sputa under denna kliniska prövning: *M. tuberculosis*, *M. avium*-komplex, *M. chelonae*, *M. fortuitum* och *M. bovis*. Den totala frekvensen falskt positiva resultat (instrumentpositiv, men utstryk och/eller fortsatt odling negativ) var 5,0%. På grund av de varierande prover som togs och testades, avvek frekvensen falskt positiva resultat signifikant från den tidigare rapporterade frekvensen för luftvägsprover. Frekvensen för växt av kontaminerande organismer i normalt sterila prover (dvs. vävnad och sterila kroppsvätskor förutom blod) varierade mellan 4,7% och 18,9%; och varierade i osterila prover (dvs. gastriska, faeces, urin, hudytas/särvätska) mellan 8,2% och 73,9%. Den totala frekvensen för växt av kontaminerande organismer var 14,9%.

REFERENSER: Se avsnittet "References" i den engelska texten.

BD Diagnostics teknisk service: Kontakta närmaste BD-representant.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Proizvođač / Gyártó / Fabricante / Аткарышы / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirker / Producent / Producător / Производитель / Výrobca / Proizvođač / Tilverkare / Üretici / Виробник



Use by / Исполняйте до / Spotřebujte do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / Uputrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейин пайдалануға / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Использовать до / Použite do / Uputrebiti do / Använd före / Son kullanna 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)  
 ЖОЖОЖ-АА-КК / ЖОЖОЖ-АА / (АА = айдың соңы)  
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)  
 GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mėnesiša beigas)  
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)  
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluten 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 = sfāršitul lunii)  
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)  
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu)  
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)  
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet av månaden)  
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)  
 PPPP-MM-ДД / PPPP-MM (ММ = кінець місяця)



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



Authorized Representative in the European Community / Оторизирани 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 / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizuirani predstavnik u Evropskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben / Representante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Representante autorizado na Comunidade Europeia / Reprezentant 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 meditsiiniaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жүзгізілетін медициналық диагностика аспабы / In vitro diagnostikos prietaisais / Medicīnas ierīces, 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 / Dispositiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский пристрій для діагностики in vitro



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



Batch Code (Lot) / Код на партидата / 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 number / 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



Contains sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Inneholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Küllaldane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / <n> тесттері үшін жеткілікті / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Satur pietiekami <n> pārbaudēm / Inhoud voldoende voor "n" testen / Innholder tilstrekkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточно для <n> тестов(а) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli malzeme içerir / Вистачить для аналізів: <n>



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 / Skatīt 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 başvurun / Див. інструкції з використання



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