

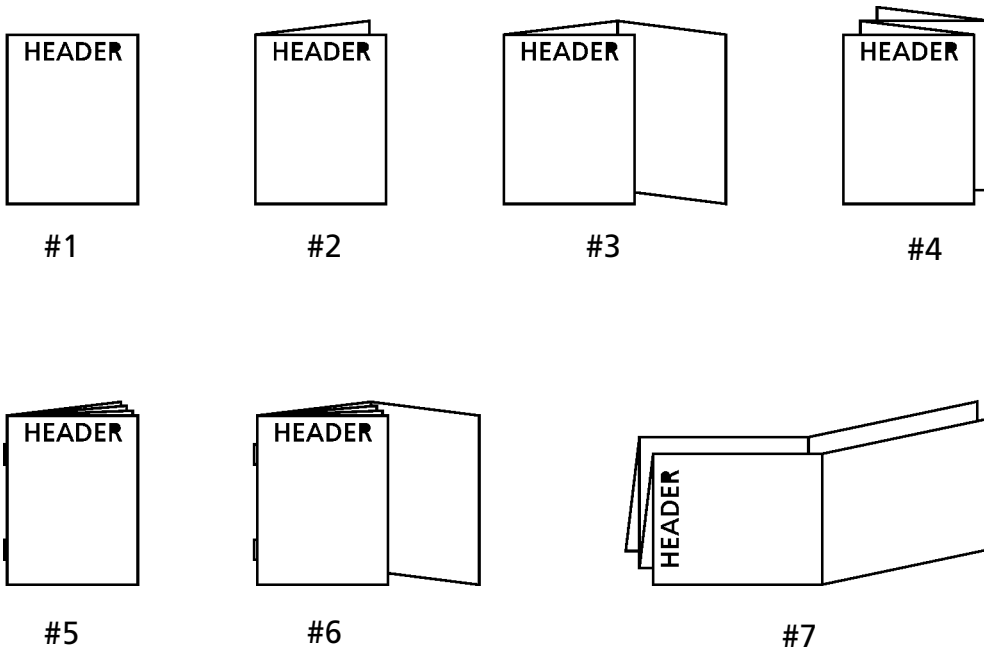
Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
0607	2010/07	5394-10

Notes:

1. BD Cat. Number 442004
2. Blank (Sheet) Size : Length: N/A Width: N/A
 Number of Pages: N/A Number of Sheets: N/A
 Page Size: Length N/A Width N/A Final Folded Size: N/A
3. Style (see illustrations below): N/A



4. See Specification Control Number VS-0250 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS# 199 Red
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA
Proofer	Date		
Checked By	Date		
Part Number: PP116JAA		Category and Description Package Insert, BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12	Sheet: 1 of 31 <hr/> Scale: 1:1

A



BD BACTEC™ 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

English: pages 1 – 5 Italiano: pagine 14 – 18
 Français : pages 5 – 9 Português: páginas 18 – 22
 Deutsch: Seiten 10 – 14 Español: páginas 23 – 27



PP116JAA
2010/07

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerininle danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзініздің жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

The qualitative BACTEC™ 12B Mycobacteria Medium is recommended for the culture and recovery of mycobacteria from clinical specimens, sputum, gastric, urine, tissue, mucopurulent specimens, other body fluids and other respiratory secretions, differentiation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex from other mycobacteria and drug susceptibility testing of *M. tuberculosis*.

SUMMARY AND EXPLANATION

The BACTEC Radiometric Technique has been widely used for the rapid recovery of mycobacteria from sputum and other clinical specimens.¹⁻⁴ All types of clinical specimens, pulmonary as well as extra-pulmonary, can be processed for BACTEC primary isolation in a manner similar to the conventional procedures.^{2,5-7} Details are provided in the CDC Manual, Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacteria.³

The sample to be tested is inoculated into one or more 12B Mycobacteria Medium vials, with a syringe through the rubber septum, and incubated. The culture vial is periodically placed into the BACTEC 460TB System instrument for testing, which consists of aspiration of the head space gas and assay of its radioactive content. A positive reading indicates the presence of viable microorganisms in the vial.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

BACTEC 12B Mycobacteria Medium is an enriched Middlebrook 7H9 broth base. If microorganisms are present in the test sample inoculated into the BACTEC vial, they utilize a ¹⁴C labeled substrate (fatty acid) present in the medium and release ¹⁴CO₂ into the atmosphere above the medium. When the vials are tested on the BACTEC 460TB System instrument, the gas is aspirated from the vial and the ¹⁴CO₂ radioactivity is determined quantitatively in terms of numbers on a scale from 0 to 999. These numbers are designated as the Growth Index (GI). The GI numbers are displayed by the BACTEC 460TB System instrument and are also printed along with the identifying rack and bottle numbers (100 GI units are approximately equal to 0.025 µCi). The daily increase in the GI is directly proportional to the rate and amount of growth in the medium.

If an inhibitory agent is introduced into the medium, inhibition of metabolism is indicated by reduced production of ¹⁴CO₂ when compared to a control having no inhibitory agent. This basic principle is applied for drug susceptibility testing and in differentiating *M. tuberculosis* complex from other mycobacteria.

The BACTEC 460TB System instrument must be used with a special TB hood when employed for Mycobacteriology. The TB hood provides HEPA filtered exhaust air and negative pressure in the test area. In addition, the TB hood is equipped with an ultraviolet light source in the test area. The unit is designed for automatic testing of vials and must not be used for inoculation or subculturing in place of a biological cabinet.

REAGENTS

The BACTEC 12B Medium culture vials contain the following reactive ingredients prior to processing:

Amount added per liter of Processed Water	
7H9 Broth	4.7 g
Casein Hydrolysate	1.0 g
Bovine Serum Albumin	5.0 g
Catalase	48,000 units
¹⁴ C-substrate	1,000 µCi

Composition may have been adjusted to meet specific performance requirements.

Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

This product contains dry natural rubber.

Pathogenic microorganisms including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"⁸⁻¹¹ and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Perform all procedures, including processing of specimens, smear preparation, inoculum preparation, making dilutions, inoculations of media, subculturing, etc., in a suitable biological safety cabinet in a room with an appropriate ventilation system as recommended by the CDC.³ Use a proper protective gown, mask, and gloves while handling specimens and cultures of potential pathogens. Follow the CDC and OSHA recommendations.

Prior to use, each vial should be examined for evidence of damage, deterioration or contamination such as cloudiness, bulging or depressed septum. **DO NOT USE** any vial showing evidence of contamination. A contaminated vial could contain positive pressure. Vial contamination may not be readily apparent.

Vials displaying turbidity, contamination, or discoloration (darkening) should not be used. Vials that exhibit evidence of damage should be discarded prior to inoculation. On rare occasions, the glass bottle may be cracked and the neck may break during removal of the flip-off cap or in handling. Also, on rare occasions a vial may not be sealed sufficiently. In both cases, the contents of the vials may leak or spill, especially if the vial is inverted. If the vial has been inoculated, treat the leak or spill with caution, as pathogenic organisms/agents may be present. Before discarding, sterilize all inoculated vials by autoclaving.

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

To minimize the potential of leakage during inoculation of specimen into culture vials, use syringes with permanently attached needles or securely fastened **Luer-Lok™** brand tips.

The rubber septum of a vial should be disinfected each time the vial is entered. Clean the top of each vial with disinfectant, followed by 70% alcohol. Use an appropriate disinfectant for cleaning the work area and swabbing the vial septum and other surfaces. The CDC states: "With so many disinfectants available, it is important to consult the product brochures to make certain that the disinfectant is bactericidal for mycobacteria."¹²

Working with a syringe and needle requires special attention and safety precautions. Use syringes with permanently attached needles or securely fastened **Luer-Lok** brand tips. Handle the syringe with appropriate caution. Do not put the cover of the needle back after use. Discard syringes in sharps containers and handle the disposal containers carefully. Refer to the NCCLS Approved Guideline M29, "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections."⁸

Storage Instructions

BACTEC 12B Mycobacteria vials should be stored at 2 – 25°C in dry place.

The medium vials are stable at the recommended storage conditions until the labeled expiration date.

It is good practice to segregate radioactive material by storage in a cabinet accessible only to authorized personnel. The cabinet should be labeled with the words "Caution: Radioactive Materials."

Do not expose the medium to direct bright light. Always initially test each 12B vial on the **BACTEC** brand 460TB System instrument to establish 5 – 10% CO₂ atmosphere in the vial and to screen out vials with high background readings. If a vial reads GI 20 or more on initial screening, discard it.

SPECIMEN COLLECTION

Specimen collection and handling should be carried out according to the standard methods which are adequately reviewed in the CDC manual³ and in the **BACTEC 460TB** System Product and Procedure Manual (MA-0029).

PROCEDURE

Materials Provided:

BACTEC 12B Medium

Materials Required But Not Provided:

BACTEC PANTA™ PLUS Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

BACTEC 460TB Instrument

Tuberculin syringe with permanently attached needle

Disinfectant solution

70% isopropyl alcohol swab

Sterile needle with filter

Processing of the Specimen: Numerous procedures for digestion and decontamination have been recommended and are being followed in various laboratories. Some procedures are known to be compatible only with egg-based media and are not suitable for use with the **BACTEC** method. Sodium Hydroxide (NaOH) and N-acetyl-L-cysteine-NaOH (NALC) methods are recommended for the **BACTEC 460TB** System. Other methods may be compatible with the **BACTEC** procedure, but have insufficient data available to demonstrate this conclusively.

For specimen collected aseptically, no decontamination procedure is required. For details see the **BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual**.

Inoculation of 12B Medium: Prior to inoculation, remove the flip-off cap from the **BACTEC** vial top and inspect for cracks, contamination, excessive cloudiness, and bulging or indented septum. **DO NOT USE** if any defect is noted.

Test all 12B Medium vials on the **BACTEC 460TB System** instrument to eliminate vials with high background (GI 20) readings and to establish a CO₂ enriched atmosphere in the vial.

12B Medium may be used as a stand-alone medium for the recovery of mycobacteria. However, for maximum recovery of mycobacteria, along with the 12B vial one tube of Lowenstein-Jensen (LJ), other modifications of LJ medium, or 7H10/7H11 (regular plate or a bi-plate) may also be inoculated.¹³ The decision to use 12B medium alone or with additional conventional media should be made after reviewing each institution's own experience and requirements, as well as after review of published data.^{4-7,14,15}

Contamination may be reduced by supplementing the medium with a mixture of antimicrobials prior to inoculation.¹⁶ **PANTA** Supplement which contains polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin is available in a lyophilized form (see the **BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual** for details). Inoculation of the specimen must be performed within 2 h of the addition of **PANTA** to the 12B Medium vial. The Reconstituting Fluid (RF) contains a growth promoting substance POES (polyoxyethylene stearate).¹⁷ Thus, it is recommended that when **PANTA** is not used, 0.1 mL of RF alone be added to 12B Medium prior to inoculation of the specimen.

Using a new sterile syringe with a permanently attached needle or **Luer-Lok** brand tip for each specimen, inoculate 0.5 mL of the well-mixed specimen concentrate into each 12B Medium vial. A higher volume will disturb the pH of the medium due to the high pH of the inoculum. However, specimens collected aseptically and not decontaminated can be inoculated with as much as 1.0 mL. Volumes greater than 1.0 mL will dilute the medium and may affect growth.

Disinfect the rubber septum of each vial with a proper disinfectant after inoculation or after sampling aliquots from an inoculated vial followed by cleaning with a 70% alcohol swab.

Inoculated vials should be incubated at 37° ± 1°C without shaking and should be tested on a **BACTEC 460TB System** instrument using 5 – 10% CO₂ in air. Test the vials every two to three days for the first two weeks and weekly thereafter, for a total of six weeks. The testing schedule may vary depending upon the work load of a laboratory.

If a specimen is suspected of containing mycobacteria which require an optimum temperature other than 37°C, (i.e., *M. marinum* and *M. chelonae* require 30°C), two sets of media should be inoculated, one set for incubation at 37°C and the second for a more optimum temperature.

Prepare a smear from a **BACTEC 12B Medium** vial at GI 50 – 100. If it is positive for AFB, report as culture positive pending identification. Subculture to a solid medium. Incubate the subculture at 37° ± 1°C.

TB Differentiation: When a 12B Medium vial GI reaches 50, perform the **BACTEC NAP** test following the recommended procedure. This procedure will differentiate TB Complex from mycobacteria other than tuberculosis (MOTT).

Speciation of mycobacteria should be carried out by the conventional techniques as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention.³

Subculturing: Prior to sampling, subculturing, or staining, put the vial in an upright position, and place an alcohol wipe over the septum. To release pressure in the vial, insert a sterile needle with an appropriate filter or pledget through the alcohol wipe and septum. The needle should be removed after the 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 twisting motions.

Drug Susceptibility Testing: Any drug susceptibility test for *M. tuberculosis* may be set up at GI 300 + 1 additional day of incubation or GI ≥500 (see the **BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual** for details).

QUALITY CONTROL

DO NOT USE vials past their expiration date.

DO NOT USE vials that exhibit any cracks or defects; discard the vial in an appropriate manner.

Quality Control Certificates are provided with each carton of media. Quality Control Certificates show test organisms, including ATCC™ cultures specified in the NCCLS standard, *Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.¹⁸

As part of the daily maintenance schedule, Performance Test Vials (**BACTEC** Performance Test Kit) should be tested on the **BACTEC** instrument. If low readings are obtained, yet Performance Test Vials were tested properly, possible instrument problems may be indicated (see **BACTEC** PTK package insert PP-046JAA).

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

RESULTS

The instrument reads out directly on a scale of 0 – 999 called a Growth Index. No calculations are required. The Growth Index is a measure of the ¹⁴CO₂ radioactivity aspirated into the ion chamber and is directly proportional to the amount of active growth in the vial.

Current Federal Regulations (CLIA '88) require that instrument printouts of test results must be associated with the appropriate patient sample. These printouts must be retained for a period of at least two years. Local or state regulations may be more restrictive than the Federal requirements: please consult those regulations for additional compliance requirements.

Once the GI reaches 10 or more, the culture should be considered “presumptive H positive” and the vial should be tested daily. The AFB smear is important for the confirmation of presence of mycobacteria. Once AFB are observed on the smear made from a positive vial, the specimen may be reported as culture positive for AFB (identification pending). Negative cultures should be reported after six weeks of incubation.

The detection time for a positive culture varies considerably due to such factors as the type of specimen, number of organisms present in the specimen, the treatment status of the patient, and the incubation temperature. Procedural differences, especially the decontamination method, may play an important role in detection time. The average detection time for *M. tuberculosis* from clinical specimens (smear-negative and smear-positive) is reported to be 7 to 12 days. MOTT bacilli are generally detected two to three days earlier than *M. tuberculosis*.^{4,6,7,14,15}

The incidence of contamination varies from laboratory to laboratory, depending upon the decontamination procedure used. Contamination in the 12B isolation vial is usually lower than routinely observed in conventional media where a contamination rate of up to 5% is acceptable. Maintain a contamination record and calculate the contamination rate periodically. Review the processing protocol and adjust if needed. A contaminated 12B Medium vial may be reprocessed, refer to the **BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual** for the procedure.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Care must be taken to prevent contamination of the sample during collection and inoculation into the **BACTEC** vial. A contaminated sample will give a positive reading but will not indicate a clinically relevant positive sample. Such a determination must be made by the user based on such factors as type of organism recovered, occurrence of the same organism in multiple cultures, patient history, appropriate equipment checks, etc. Contamination may also result from improper maintenance of **BACTEC** needles and tubing, poor septum cleansing or malfunction of the **BACTEC** needle heating unit (see the **BACTEC 460TB Operation and Maintenance Manual**).

The GI level reflects the rate and amount of growth occurring in the medium but cannot be as accurately quantified as by colony counts on solid media. Colonial morphology and pigmentation characteristics can only be determined on solid media.

Due to the nature of biological materials in media products and inherent organism variability, the user shall be cognizant of potential variable results in the recovery of certain organisms.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In a study by Tortoli et al., recovery of mycobacteria was compared in two automatic systems and one manual system. The **BACTEC 460** system using 12B Mycobacteria Medium yielded 201 isolates, in comparison with 190 isolates with the **BACTEC MGIT 960** system and 167 isolates with Lowenstein-Jensen medium. The average time to detection using the **BACTEC 460** and 12B medium was 14.8 days.¹⁹

TABLE 1. Recovery of mycobacteria by individual systems and combinations of systems^a

Mycobacterium or specimen	Total no. (%) recovered					
	All media	BACTEC MGIT 960 system	BACTEC 460 system	Lowenstein-Jensen medium	BACTEC MGIT 960 system + Lowenstein-Jensen medium	BACTEC 460 system + Lowenstein-Jensen medium
All	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
<i>M. tuberculosis</i> complex	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
<i>M. avium</i> complex	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Other MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Smear positive	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Smear negative	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a More frequently occurring taxa are considered separately, as were smear-positive and smear-negative specimens.

^b MOTT, mycobacteria other than *M. tuberculosis*.

AVAILABILITY

Cat. No. Description

442004	BACTEC™ 12B Medium, 4 mL, 100 per carton
444764	BACTEC™ PANTA™ Plus Kit, lyophilized antimicrobial supplement (PANTA), 5 vials; Reconstituting Fluid, 10 mL, 5 vials
442103	BACTEC™ NAP Differentiation Kit, 5 µg NAP per vial, 10 vials per carton
445203	BACTEC™ 460TB System Instrument
442102	BACTEC™ SIRE Drug Kit (100 tests)
442104	BACTEC™ Diluting Fluid (10 tests)
442146	Isoniazid, 1 vial
442139	PZA Test Medium (5 Tests)
442143	PZA Drug/Reconstituting Fluid (50 tests)

REFERENCES

1. Middlebrook, G. et al. Automated radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115:1066-1069, 1977.
2. Bannister, E.R. et al. Comparison of detection, identification and drug susceptibility testing of mycobacteria by using the BACTEC radiometric method and conventional methods. Abstract C260, A.S.M. Annual Meeting, Las Vegas, 1985.
3. Kent, P.T. et al. Public health mycobacteriology, a guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, Division of Laboratory Training and Consultation. Atlanta, GA, 1985.
4. Roberts, G.D. et al. Evaluation of BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:689-696, 1983.
5. Fadda, G. et al. Recovery and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from extrapulmonary specimens by the BACTEC radiometric method. *J. Clin. Microbiol.* 19:720-721, 1984.
6. Morgan, M.A. et al. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:384-388, 1983.
7. Takahashi, H. et al. Detection and recovery of mycobacteria by a radiometric procedure. *J. Clin. Microbiol.* 17:380-381, 1983.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, PA.
9. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
10. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
11. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
12. Kent, P.T. et al. Public health mycobacteriology: Centrifugal efficiency and digestant toxicity. Abstract U-2. A.S.M. Annual Meeting, St. Louis, MO, 1984.
13. Libonati, J.P. et al. The role of solid media in the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification. Abstract U-71. A.S.M. Meeting, Atlanta, GA, 1987.
14. Kirihaara, J. M. et al. Improved detection times of *Mycobacterium avium* complex and *M. tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J. Clin. Microbiol.* 22:841-845, 1985.
15. Park, C.H. et al. Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technique. *Am. J. Clin. Path.* 81:341-345, 1984.
16. Siddiqi, S.H. et al. A new antimicrobial mixture (polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim and azlocillin) for effective suppression of non-mycobacterial contamination during primary isolation of mycobacteria. Abstract U-35. A.S.M. Meeting, Washington, D.C., 1986.
17. Siddiqi, S.H. Studies to further enhance mycobacterial growth in radiometric 7H12 Medium. Abstract U-46. A.S.M. Annual Meeting, Las Vegas, NV, 1985.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1996. Approved Standard M22-A2, Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media, 2nd ed., NCCLS, Wayne, PA.
19. Tortoli, E., P. Cinchero, C. Piersimoni, M.T. Simonetti, G. Gesu, and D. Nista. 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria for clinical specimens: multicenter study. *J. Clin Microbiol.* 37:3578-3582.



BD BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

Français

APPLICATION

Le BACTEC 12B Mycobacteria Medium (milieu qualitatif pour mycobactéries BACTEC 12B) est recommandé pour la culture et la mise en évidence des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques, d'expectorations, d'aspirés gastriques, d'urine, de tissus, d'échantillons mucopurulents, ainsi que d'autres liquides physiologiques et d'autres sécrétions du système respiratoire. Il est aussi recommandé pour différencier le complexe *Mycobacterium tuberculosis* des autres mycobactéries et pour déterminer le patron de sensibilité aux antibiotiques de *M. tuberculosis*.

RESUME ET EXPLICATION

La technique **BACTEC** Radiometric Technique a été largement utilisée pour la mise en évidence rapide de mycobactéries à partir d'expectorations et d'autres échantillons cliniques.¹⁻⁴ Pour effectuer l'isolement primaire selon la méthode **BACTEC**, tous les types d'échantillons cliniques, pulmonaires aussi bien qu'extra-pulmonaires, peuvent être préparés d'une manière semblable à celle utilisée pour les méthodes conventionnelles.^{2,5-7} Les détails sont fournis dans le manuel des CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention), Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacteria.³

L'échantillon à analyser est inoculé dans un ou plusieurs flacons de 12B Mycobacteria Medium, puis incubé. L'inoculation se fait à l'aide d'une seringue piquée à travers le bouchon en caoutchouc du flacon. Périodiquement, le flacon de culture est placé dans l'appareil **BACTEC** 460TB System pour analyse ; l'atmosphère au-dessus du bouillon 12B est alors aspirée et analysée afin de déterminer son contenu radioactif. Une lecture positive indique la présence de microorganismes viables dans le flacon.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le **BACTEC** 12B Mycobacteria Medium est un bouillon Middlebrook 7H9 Broth Base enrichi. Lorsque des microorganismes sont présents dans l'échantillon inoculé dans le flacon **BACTEC**, ils utilisent un substrat (acide gras) radio-marqué au ¹⁴C présent dans le milieu et libèrent du ¹⁴CO₂ dans l'atmosphère au-dessus du milieu. Lorsque les flacons sont testés avec l'appareil **BACTEC** 460TB System, le gaz présent dans le flacon est aspiré et son contenu en ¹⁴CO₂ radioactif est déterminé quantitativement et exprimé selon une échelle numérique allant de 0 à 999. Ces valeurs sont désignées comme Index de croissance (Growth Index : GI). Les valeurs GI sont affichées par l'appareil **BACTEC** 460TB System et sont également imprimées avec les numéros identifiant les portoirs et les flacons qui leur correspondent (100 unités GI représentent environ 0,025 µCi). L'augmentation quotidienne de la valeur GI est directement proportionnelle au nombre de bactéries et à leur taux de croissance dans le milieu.

Lorsqu'un agent inhibiteur est introduit dans le milieu, l'inhibition du métabolisme est mise en évidence par une réduction de la production de ¹⁴CO₂ par rapport à un échantillon contrôle ne contenant pas d'inhibiteur. Ce principe de base est appliqué au test de sensibilité aux antibiotiques et pour différencier le complexe *M. tuberculosis* des autres mycobactéries.

L'appareil **BACTEC** 460TB System doit être utilisé avec une hotte TB spéciale lorsqu'il est utilisé en mycobactériologie. La hotte TB fournit de l'air aspiré et traité par un filtre HEPA et assure une pression négative dans cette même zone. De plus, la hotte TB est équipée d'une source de lumière ultraviolette dans la zone test. Cette hotte est conçue pour le test automatique de flacons et ne doit pas servir pour l'inoculation ou le repiquage au lieu d'une hotte biologique de sécurité.

REACTIFS

Avant traitement, les flacons de milieu de culture **BACTEC** 12B Medium contiennent les réactifs suivants :

Quantité ajoutée par litre d'eau traitée	
7H9 Broth	4,7 g
Caséine hydrolysée	1,0 g
Sérum albumine bovine	5,0 g
Catalase	48 000 unités
Substrat au ¹⁴ C	1 000 µCi

La composition peut avoir été modifiée pour se conformer aux besoins particuliers du laboratoire.

Avertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »⁸⁻¹¹ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Toutes les manipulations, y compris le traitement des échantillons, la préparation des frottis et des inoculum, les dilutions, l'inoculation des milieux, les repiquages, etc., doivent être effectuées sous une hotte biologique de sécurité dans une pièce munie d'un système approprié de ventilation tel que recommandé par les CDC.³ Lors de la manipulation des échantillons et des cultures de pathogènes potentiels, porter une blouse protectrice adéquate, un masque et des gants. Suivre les recommandations des CDC et de l'OSHA (U.S. Occupational Safety and Health Administration).

Avant utilisation, il convient d'examiner les flacons pour vérifier s'ils sont endommagés ou présentent des signes de détérioration ou de contamination tels qu'une turbidité, ou un bouchon bombé ou concave. **NE PAS UTILISER** un flacon présentant des signes de contamination. Un flacon contaminé peut être sous pression positive. La contamination d'un flacon peut ne pas être immédiatement apparente.

Il ne faut pas utiliser un flacon dont le milieu est trouble, contaminé ou décoloré (foncé). Les flacons montrant des signes d'endommagement doivent être jetés avant l'inoculation. Occasionnellement, le goulot du flacon en verre peut être fêlé et casser pendant le retrait de la capsule de protection ou pendant les manipulations. De plus, de temps à autre, un flacon peut ne pas être suffisamment bouché. Dans les deux cas, le contenu du flacon risque de fuir ou de se répandre, surtout si le flacon est inversé. Si le flacon a été inoculé, traiter la fuite ou le liquide répandu avec précaution, des microorganismes ou agents pathogènes pouvant être présents. Avant de les jeter, stériliser à l'autoclave tous les flacons inoculés.

Flacons contenant une culture positive destinée au repiquage ou à la coloration, etc. : Avant d'effectuer un prélèvement, il est nécessaire de libérer le gaz qui peut s'être accumulé suite au métabolisme bactérien. Les inoculations et les prélèvements doivent être effectués sous une hotte biologique de sécurité, et il convient de porter des vêtements de protection appropriés, notamment des gants et un masque. Pour plus d'informations sur le repiquage, voir la rubrique **Méthode**.

Pour minimiser le risque de fuite pendant l'inoculation de l'échantillon dans les flacons de culture, utiliser des seringues munies d'aiguilles inamovibles ou d'embouts **Luer-Lok** solidement attachés.

Le bouchon en caoutchouc du flacon doit être désinfecté chaque fois que le flacon est utilisé. Nettoyer le dessus de chaque flacon avec un désinfectant, puis avec de l'alcool à 70 %. Utiliser un désinfectant approprié pour nettoyer la surface de travail et pour essuyer le bouchon du flacon et les autres surfaces. Selon les CDC : « Compte tenu du grand nombre de désinfectants disponibles, il est important de consulter la notice d'emploi du produit afin de s'assurer que le désinfectant est bactéricide pour les mycobactéries ». ¹²

Le travail avec une seringue équipée d'une aiguille demande une attention et des précautions de sécurité particulières. Utiliser des seringues munies d'aiguilles inamovibles ou d'embouts **Luer-Lok** solidement attachés. Manipuler la seringue en prenant les précautions appropriées. Ne pas remettre le capuchon protecteur sur l'aiguille après utilisation. Jeter les seringues dans des contenants pour objets pointus et manipuler ces contenants avec précaution. Se référer à la directive approuvée du NCCLS M29, « Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections ». ⁸

Instructions pour la conservation

Les flacons de **BACTEC 12B Mycobacteria** doivent être conservés entre 2 et 25 °C, dans un endroit sec.

Les flacons de milieu sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés selon les conditions de stockage recommandées.

Il est de bon usage d'isoler le matériel radioactif en le conservant dans une armoire accessible seulement au personnel autorisé. Cette armoire sera étiquetée « Attention : matière radioactive ».

Ne pas exposer le milieu à la lumière directe du soleil. Toujours commencer par tester chaque flacon de milieu 12B sur l'appareil **BACTEC 460TB System** pour établir une atmosphère de 5 à 10 % en CO₂ dans le flacon et pour rejeter tout flacon présentant un bruit de fond trop haut. Rejeter tout flacon donnant une valeur GI égale ou supérieure à 20 lors de cette première lecture.

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Le prélèvement et la manipulation des échantillons devront être effectués selon les méthodes standard décrites dans le manuel des CDC³ et dans le manuel de l'utilisation du **BACTEC 460TB System (MA-0029)**.

PROCEDURE

Matériaux fournis :

BACTEC 12B Medium

Matériaux requis mais non fournis :

BACTEC PANTA Plus Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

BACTEC 460TB Instrument

Seringue tuberculique avec aiguille non amovible

Solution de désinfectant

Tampon imbibé d'alcool isopropylique à 70 %

Aiguille stérile avec filtre

Traitement de l'échantillon : De nombreuses méthodes de digestion et de décontamination ont été recommandées et sont suivies dans divers laboratoires. Certaines méthodes sont reconnues comme n'étant compatibles qu'avec les milieux à base d'œuf ; elles ne sont pas utilisables avec la méthode **BACTEC**. Les méthodes basées sur l'hydroxyde de sodium (NaOH) et le N-acétyl-L-cystéine-NaOH (NALC) sont recommandées avec le **BACTEC 460TB System**. D'autres méthodes peuvent être compatibles avec la méthode **BACTEC**, mais les données à ce sujet sont insuffisantes pour en faire une démonstration concluante.

L'étape de décontamination n'est pas requise pour les échantillons prélevés de façon aseptique. Pour plus de détails, se référer au manuel de l'utilisation du système **BACTEC 460TB**.

Inoculation du milieu 12B : Avant l'inoculation, retirer la capsule de protection du flacon **BACTEC** et examiner le flacon pour des signes de fêlure ou de contamination, une turbidité excessive, ou un bouchon bombé ou concave. **NE PAS UTILISER** le flacon si on note un défaut.

Tester tous les flacons de 12B Medium sur l'appareil **BACTEC 460TB System** afin d'éliminer les flacons présentant un bruit de fond trop haut (GI 20) et pour établir une atmosphère enrichie en CO₂ dans le flacon.

Le 12B Medium peut être utilisé comme milieu unique pour la mise en évidence des mycobactéries. Cependant, pour obtenir un taux de mise en évidence maximal, on peut ensemercer en parallèle un tube de milieu Lowenstein-Jensen (LJ) ou de milieux LJ modifiés, ou une boîte (ou double boîte) de milieu 7H10/7H11. ¹³ Afin de décider si l'on utilise le milieu 12B seul ou en conjonction avec d'autres milieux conventionnels, on devra d'abord passer en revue l'expérience et les besoins du laboratoire, ainsi que les publications pertinentes. ^{4-7,14,15}

On peut réduire le degré de contamination par l'addition d'un mélange d'agents antimicrobiens au milieu avant de l'ensemencer. ¹⁶ Le **PANTA Supplement**, qui contient de la polymyxine B, de l'amphotéricine B, de l'acide nalidixique,

du triméthoprim et de l'azlocilline, est disponible sous forme lyophilisée (pour plus de détails, se référer au manuel de l'utilisation du système **BACTEC 460TB**). L'échantillon doit être inoculé dans les 2 h après l'addition du supplément **PANTA** au flacon de 12B Medium. Le fluide de reconstitution (Reconstituting Fluid - RF) contient une substance favorisant la croissance, le POES (stéarate de polyoxyéthylène).¹⁷ Il est donc recommandé, lorsque le supplément **PANTA** n'est pas utilisé, d'ajouter 0,1 mL de RF seul au 12B Medium avant d'ensemencer l'échantillon.

Pour chaque échantillon, utiliser une nouvelle seringue stérile munie d'une aiguille inamovible ou d'un embout **Luer-Lok**, ensemercer 0,5 mL d'échantillon concentré, bien mélangé, dans chaque flacon de 12B Medium. A cause du pH élevé de l'inoculum, un volume d'inoculum plus grand débalancerait le pH du milieu. Cependant, dans le cas d'échantillons prélevés de façon aseptique et non décontaminés, on peut ensemercer jusqu'à 1,0 mL dans le flacon. Les volumes supérieurs à 1,0 mL vont diluer le milieu et peuvent affecter la croissance.

Après l'inoculation d'un flacon ou le prélèvement d'une aliquote à partir d'un flacon inoculé, désinfecter le bouchon en caoutchouc de chaque flacon avec un désinfectant approprié, puis nettoyer avec un tampon de gaze imbibé d'alcool à 70 %.

Les flacons inoculés doivent être incubés à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ sans agitation et doivent être testés sur un analyseur **BACTEC 460TB System** avec de l'air contenant 5 à 10 % de CO_2 . Tester les flacons tous les deux ou trois jours durant les deux premières semaines, puis une fois par semaine, jusqu'à un total de six semaines. Les horaires de lecture peuvent varier selon la charge de travail du laboratoire.

Si l'on soupçonne qu'un échantillon contient des mycobactéries nécessitant une température optimale d'incubation autre que 37°C , (p. ex., *M. marinum* et *M. chelonae* demandant une température de 30°C), deux séries de flacons de culture doivent être inoculés, une série pour incubation à 37°C et l'autre pour incubation à une température jugée optimale.

Préparer un frottis à partir d'un flacon de **BACTEC 12B Medium** lorsque le GI a une valeur comprise entre 50 et 100. Si le frottis est positif pour des bacilles acido-résistants, rapporter la culture comme positive, en attente d'une identification. Repiquer sur un milieu solide. Incuber le repiquage à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$.

Différenciation B.K. : Lorsque le GI d'un flacon de 12B Medium atteint 50, effectuer le test **BACTEC NAP** en suivant la méthode recommandée. Cette méthode va différencier le complexe TB des mycobactéries autres que tuberculosis (MOTT).

L'identification de l'espèce mycobactérienne devrait être effectuée selon les méthodes conventionnelles recommandées par les CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention).³

Repiquage : Avant d'effectuer un prélèvement, un repiquage ou une coloration, poser le flacon debout et placer un coton imbibé d'alcool sur le bouchon. Pour relâcher la pression dans le flacon, insérer une aiguille stérile munie d'un filtre ou d'une compresse adéquats à travers le coton imbibé d'alcool et le bouchon. L'aiguille doit être retirée après le 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.

Test de sensibilité aux antibiotiques : Lorsque le GI atteint la valeur de 300, incuber un jour de plus, puis amorcer tout test de sensibilité aux antibiotiques pour *M. tuberculosis* ; lorsque le GI est supérieur ou égale à 500, le test peut être commencé la journée même (pour plus de détails, se référer au manuel de l'utilisation du système **BACTEC 460TB**).

CONTROLE DE QUALITE

NE PAS UTILISER les flacons au-delà de leur date de péremption.

NE PAS UTILISER les flacons présentant des fêlures ou des défauts ; éliminer le flacon de façon appropriée.

Des certificats de contrôle de qualité se trouvent dans chaque carton de milieux. Les certificats de contrôle de qualité présentent les microorganismes de test comprenant les cultures ATCC spécifiées dans la norme **NCCLS, Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media**.¹⁸

Dans le cadre du programme d'entretien journalier, les flacons témoin (**BACTEC Performance Test Kit**) doivent être testés sur l'appareil **BACTEC**. Si des lectures basses sont obtenues bien que les flacons témoin aient été testés correctement, des problèmes d'instrumentation pourraient être en cause (voir la notice d'emploi **BACTEC PTK (PP-046JAA)**).

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives **NCCLS** et la réglementation **CLIA** concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

L'appareil effectue une lecture directe sur une échelle allant de 0 à 999 appelée Index de croissance (Growth Index : GI). Aucun calcul n'est nécessaire. L'index de croissance est une mesure de la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ radioactif aspiré dans la chambre à ions. Il est directement proportionnel au taux de croissance présent dans le flacon.

Aux Etats-Unis, les réglementations fédérales actuelles (CLIA '88) requièrent que les résultats imprimés par l'appareil soient associés sur l'imprimé avec le numéro d'échantillon clinique approprié. Ces imprimés doivent être conservés pendant au moins deux ans. Les réglementations locales et provinciales peuvent être plus restrictives que celles du gouvernement fédéral : consulter ces réglementations pour identifier les exigences de conformité supplémentaires.

Une fois que le GI atteint une valeur de 10 ou plus, la culture doit être considérée comme « présumée positive » et le flacon doit être testé quotidiennement. Le frottis pour bacilles acido-résistants est important pour confirmer la présence de mycobactéries. Une fois que des bacilles acido-résistants sont observés sur un frottis fait à partir d'un flacon positif, on peut rapporter l'échantillon comme donnant une culture positive pour des bacilles acido-résistants (en attente d'une identification). Les cultures négatives doivent être signalées après six semaines d'incubation.

Le temps nécessaire pour détecter une culture positive varie considérablement en fonction de certains facteurs tels que le type d'échantillon, le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon, le traitement reçu par

le patient et la température d'incubation. Des différences dans les méthodes, en particulier en ce qui concerne la méthode de décontamination, peuvent jouer un rôle important quant au temps de détection requis. Un temps moyen de 7 à 12 jours a été rapporté pour détecter *M. tuberculosis* à partir d'échantillons cliniques (frottis positifs et négatifs). Les bacilles du groupe MOTT sont généralement détectés deux à trois jours avant *M. tuberculosis*.^{4,6,7,14,15}

Le taux de contamination varie d'un laboratoire à l'autre suivant la méthode de décontamination utilisée. Le taux de contamination des flacons de milieu 12B lors d'isolements est généralement plus bas que celui observé habituellement dans les milieux conventionnels où un taux de contamination allant jusqu'à 5 % est acceptable. Maintenir un dossier sur la contamination et calculer périodiquement le taux de contamination. Revoir le protocole de traitement et faire des ajustements si nécessaire. Un flacon de 12B Medium contaminé peut être de nouveau traité, se référer au manuel de l'utilisation du système **BACTEC 460TB** pour la méthode appropriée.

LIMITES DE LA PROCEDURE

Des mesures adéquates doivent être prises afin de prévenir une contamination de l'échantillon durant le prélèvement et lors de l'inoculation du flacon **BACTEC**. Un échantillon contaminé donnera une lecture positive mais n'indiquera pas un échantillon cliniquement significatif. Une telle détermination doit être faite par l'utilisateur sur la base de facteurs tels que le type de microorganisme mis en évidence, la présence du même microorganisme dans plusieurs cultures, les antécédents du patient, des vérifications appropriées des instruments, etc. Une contamination peut aussi résulter d'un entretien inadéquat des aiguilles et de la tubulure de l'appareil **BACTEC**, d'un nettoyage inadéquat du bouchon du flacon ou d'une déficience de l'unité de chauffage des aiguilles **BACTEC** (voir le Manuel d'opération et d'entretien de l'appareil **BACTEC 460TB**).

La valeur GI reflète le nombre de bactéries et leur taux de croissance dans le milieu ; cependant ces valeurs ne sont pas quantifiées aussi exactement qu'avec un compte de colonies sur milieu solide. La morphologie des colonies et leurs caractéristiques de pigmentation ne peuvent être déterminées que sur un milieu solide.

En raison de la nature du matériel biologique présent dans les milieux de culture et de la variabilité inhérente aux microorganismes, l'utilisateur doit savoir qu'une variation des résultats est possible lors de la mise en évidence de certains microorganismes.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Dans une étude par Tortoli et al., la mise en évidence de mycobactéries a été comparée sur deux systèmes automatiques et un système manuel. Les isolats obtenus sur le système **BACTEC 460** avec le 12B Mycobacteria Medium ont été 201, par rapport aux 190 isolats obtenus sur le système **BACTEC MGIT 960**, et aux 167 isolats avec le milieu de Lowenstein-Jensen. Le temps moyen de détection avec le système **BACTEC 460** et le milieu 12B était de 14,8 jours.¹⁹

TABLEAU 1. Mise en évidence de mycobactéries par des systèmes seuls et des systèmes associés^a

Mycobactérie ou échantillon	Nombre total (%) mis en évidence					
	Tous les supports	Système BACTEC MGIT 960	Système BACTEC 460	Milieu de Lowenstein-Jensen	Système BACTEC MGIT 960 + milieu de Lowenstein-Jensen	Système BACTEC 460 + milieu de Lowenstein-Jensen
Tous	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
Complexe <i>M. tuberculosis</i>	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
Complexe <i>M. avium</i>	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Autre MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Frottis positifs	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Frottis négatifs	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a Les taxies les plus fréquentes sont traitées séparément, tout comme les échantillons donnant des frottis positifs et négatifs.

^b MOTT, mycobactéries autres que *M. tuberculosis*.

CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
442004	BACTEC 12B Medium , 4 mL, 100 par carton
444764	BACTEC PANTA Plus Kit , supplément antimicrobien lyophilisé (PANTA), 5 flacons ; fluide de reconstitution, 10 mL, 5 flacons
442103	BACTEC NAP Differentiation Kit , 5 µg de NAP par flacon, 10 flacons par carton
445203	BACTEC 460TB System Instrument
442102	BACTEC SIRE Drug Kit (100 tests)
442104	BACTEC Diluting Fluid (10 tests)
442146	Isoniazide, 1 flacon
442139	PZA Test Medium (5 tests)
442143	PZA Drug/Reconstituting Fluid (50 tests)

REFERENCES : Voir la rubrique « References » du texte anglais.

BD BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das qualitative **BACTEC 12B Mycobacteria Medium** wird zur Kultivierung und Isolierung von Mykobakterien aus klinischen Proben, Sputum, Magensaft, Urin, Gewebe, mukopurulenten Proben, anderen Körperflüssigkeiten und anderen Sekretionen der Atemwege, zur Differenzierung des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes von anderen Mykobakterien sowie zur Arzneimittelempfindlichkeitsprüfung *M. tuberculosis* empfohlen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die radiometrische **BACTEC**-Methode wird häufig zur schnellen Isolierung von Mykobakterien aus Sputum und anderen klinischen Proben angewendet.¹⁻⁴ Alle Arten von pulmonalen sowie extrapulmonalen klinischen Proben können für die **BACTEC**-Erstisolierung auf ähnliche Weise wie für konventionelle Isolationsverfahren verarbeitet werden.^{2,5-7} Einzelheiten sind im CDC-Handbuch (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacteria beschrieben.³

Die zu untersuchende Probe wird mit Hilfe einer Spritze durch das Gummiseptum in ein oder mehrere Fläschchen mit 12B Mycobacteria Medium inokuliert und inkubiert. Das Kulturfläschchen wird in regelmäßigen Abständen in ein **BACTEC 460TB**-Gerät zum Testen eingesetzt, wobei die Überstandsatmosphäre abgesaugt und ihre Radioaktivität gemessen wird. Ein positiver Befund zeigt die Anwesenheit von lebensfähigen Mikroorganismen im Fläschchen an.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Das **BACTEC 12B Mycobacteria Medium** ist eine angereicherte Middlebrook 7H9-Bouillonbase. Falls die in das **BACTEC**-Fläschchen inokulierte Probe Mikroorganismen enthält, verwerten diese das darin enthaltene ¹⁴C-markierte Substrat (Fettsäure), wobei ¹⁴CO₂ in die Überstandsatmosphäre freigesetzt wird. Beim Testen der Fläschchen im **BACTEC 460TB**-Gerät wird das Gas abgesaugt, die ¹⁴CO₂-Radioaktivität quantitativ bestimmt und auf einer Zahlenskala von 0 bis 999 angezeigt. Diese Zahlenwerte werden als Wachstumsindex (Growth Index oder GI) bezeichnet. Die GI-Werte werden auf dem **BACTEC 460TB**-Gerät angezeigt und zusammen mit der Gestell- und Fläschchen-Identifikationsnummern ausgedruckt (100 GI-Einheiten entsprechen ungefähr 0,025 µCi). Der tägliche Anstieg des GI-Werts ist direkt proportional zur Vermehrungsrate und dem im Medium erreichten Wachstum.

Bei Zugabe eines Hemmstoffs zum Nährmedium zeigt sich die metabolische Hemmung als verminderte ¹⁴CO₂-Produktion im Vergleich zur Kontrolle, die keinen Hemmstoff enthält. Auf diesem Grundprinzip beruht sowohl die Arzneimittelempfindlichkeitsprüfung als auch die Differenzierung des *M. tuberculosis*-Komplexes von anderen Mykobakterien.

Wenn das **BACTEC 460TB**-Gerät für mykobakterielle Untersuchungen eingesetzt wird, muss es mit einer speziellen TB-Haube verwendet werden. Die TB-Haube ist mit einem HEPA-Filter für die Abluft ausgestattet und erzeugt den benötigten Unterdruck im Testbereich. Zusätzlich ist die TB-Haube mit einem UV-Strahler im Testbereich ausgerüstet. Die Haube ist nur für die automatische Fläschchenprüfung bestimmt und darf nicht als Ersatz für eine biologischen Sicherheitswerkbank beim Inokulieren bzw. Subkultivieren verwendet werden.

REAGENZIEN

Die **BACTEC 12B Medium**-Fläschchen enthalten vor der Verarbeitung die folgenden reaktiven Bestandteile:

Hinzugefügte Menge pro 1 L demineralisiertes Wasser	
7H9-Bouillon	4,7 g
Caseinhydrolysat	1,0 g
Rinderserumalbumin	5,0 g
Katalase	48.000 Einheiten
¹⁴ C-markiertes Substrat	1.000 µCi

Die Zusammensetzung kann gemäß speziellen Leistungsanforderungen abgeändert worden sein.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

Dieses Produkt enthält Naturlatex (getrocknet).

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen wie Hepatitis-Viren und HIV enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁸⁻¹¹ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Sämtliche Verfahren, einschließlich der Probenverarbeitung, Ausstrichanfertigung, Inokulumvorbereitung, Zubereitung von Verdünnungen, Inokulation von Medien, Subkultivieren usw. müssen in einer geeigneten biologischen Sicherheitswerkbank in einem Raum mit einem entsprechenden Entlüftungssystem in Anlehnung an die Empfehlungen der CDC³ durchgeführt werden. Während der Handhabung von Proben und Kulturen

potenziell pathogener Mikroorganismen sollte geeignete Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Gesichtsmaske getragen werden. Befolgen Sie bitte die Empfehlungen der CDC und der OSHA (U.S. Occupational Safety and Health Administration).

Vor Gebrauch muss jedes Fläschchen auf Anzeichen von Beschädigung, Verfall oder Kontamination wie Trübung, Wölbung oder Einbeulung des Septums überprüft werden. Fläschchen, die Anzeichen von Kontamination aufweisen, **NICHT VERWENDEN**. Kontaminierte Fläschchen können Überdruck erzeugen. Die Kontamination eines Fläschchens ist nicht in allen Fällen sichtbar.

Fläschchen, die Trübung, Kontamination oder Verfärbung (Dunkelwerden) aufweisen, dürfen nicht verwendet werden. Fläschchen, die Anzeichen von Beschädigung aufweisen, müssen vor der Inokulation verworfen werden. In seltenen Fällen kann der gläserne Fläschchenhals einen Sprung haben und beim Entfernen des Abrissdeckels oder während der Handhabung des Fläschchens brechen. Auch kann es in seltenen Fällen vorkommen, dass ein Fläschchen nicht richtig verschlossen ist. In beiden Fällen ist es möglich, dass der Fläschcheninhalt ausläuft oder verschüttet wird, besonders wenn das Fläschchen umgedreht wird. Falls das betreffende Fläschchen bereits inokuliert war, muss das ausgelaufene oder verschüttete Medium mit äußerster Vorsicht behandelt werden, da es pathogene Organismen oder Erreger enthalten kann. Vor ihrer Beseitigung müssen alle inokulierten Fläschchen im Autoklaven sterilisiert werden.

Positive Kulturfläschchen zur Subkultivierung oder Färbung usw.: Vor der Probenentnahme muss Gas abgelassen werden, das sich häufig als Folge mikrobiellen Stoffwechsels ansammelt. Inokulation und Probenentnahme sollten möglichst in einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt werden und geeignete Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Gesichtsmaske sollte getragen werden. Nähere Einzelheiten zur Subkultivierung sind dem Abschnitt **Verfahren** zu entnehmen.

Um potenzielle Sickerverluste bei der Inokulation von Proben in Kulturfläschchen so weit wie möglich auszuschließen, sollten Spritzen mit fest eingesetzten Kanülen oder fest verschlossenen **Luer-Lok**-Kegeln verwendet werden.

Das Gummiseptum eines Fläschchens muss vor jedem Einstich desinfiziert werden. Das obere Ende jedes Fläschchens mit Desinfektionsmittel und danach mit 70%igem Alkohol reinigen. Zur Reinigung der Arbeitsfläche und des Septums des Fläschchens sowie anderer Arbeitsflächen ist ein geeignetes Desinfektionsmittel zu verwenden. Die CDC erklären hierzu: „In Anbetracht der breiten Auswahl an Desinfektionsmitteln ist es wichtig, sich anhand der Produktinformationen zu vergewissern, dass das Desinfektionsmittel für Mykobakterien bakterizid ist“.¹²

Das Arbeiten mit Spritze und Kanüle erfordert besondere Aufmerksamkeit und Sicherheitsmaßnahmen. Es sollten Spritzen mit fest eingesetzten Kanülen oder fest verschlossenen **Luer-Lok**-Kegeln verwendet werden. Die Spritze ist mit entsprechender Vorsicht zu handhaben. Die Kanülenschutzhülse nach Gebrauch nicht wieder aufsetzen. Spritzen müssen in einem punktionssicheren Abfallbehälter entsorgt werden. Siehe NCCLS-Richtlinie M29 „Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections“.⁸

Aufbewahrung

BACTEC 12B Mycobacteria-Fläschchen müssen trocken bei 2 – 25 °C gelagert werden.

Unter den empfohlenen Lagerbedingungen sind die Medienfläschchen bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Es wird empfohlen, radioaktives Material getrennt in einem Schrank aufzubewahren, der nur autorisierten Personen zugänglich ist. Der Schrank sollte mit dem Warnschild „Vorsicht! Radioaktives Material“ gekennzeichnet werden.

Das Medium nicht direkter heller Lichteinstrahlung aussetzen. Vor Verwendung jedes 12B-Fläschchen im **BACTEC 460TB**-Gerät überprüfen, um die Fläschchen mit 5 – 10 % CO₂-Atmosphäre zu füllen und Fläschchen mit hohem Leerwert auszusondern. Fläschchen mit einem anfänglichen GI-Wert von 20 oder höher entsorgen.

PROBENENTNAHME

Probenentnahme und -handhabung sind gemäß den Standardverfahren durchzuführen, die im CDC-Handbuch³ und im Produkt- und Verfahrenshandbuch für das **BACTEC 460TB**-System (MA-0029) ausführlich beschrieben sind.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:

Bactec 12B Medium

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:

BACTEC PANTA PLUS Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

BACTEC 460TB Instrument

Tuberkulinspritze mit fest eingesetzter Kanüle

Desinfektionslösung

70 % Isopropyl-Alkoholtupfer

Sterile Kanüle mit Filter

Probenverarbeitung: Viele Methoden werden zur Hydrolyse und Dekontamination empfohlen und von Labors praktiziert. Einige davon eignen sich nur für Eiernährmedien und sind für die **BACTEC**-Methode ungeeignet. Für das **BACTEC 460TB**-System werden Methoden unter Verwendung von Natriumhydroxid (NaOH)

und N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC) empfohlen. Andere Methoden mögen zwar mit dem **BACTEC**-Verfahren kompatibel sein, jedoch liegen keine ausreichenden Daten für einen definitiven Nachweis vor.

Bei aseptisch entnommenen Proben ist keine Dekontamination erforderlich. Einzelheiten entnehmen Sie bitte dem Produkt- und Verfahrenshandbuch für das **BACTEC 460TB**-System.

Inokulation des 12B-Mediums: Vor der Inokulation den Abrissdeckel vom **BACTEC**-Fläschchen entfernen und das Fläschchen auf Sprünge, Kontamination, übermäßige Trübung und Wölbung oder Einbeulung des Septums überprüfen. Defekte Fläschchen **NICHT VERWENDE**N.

Alle 12B Medium-Fläschchen müssen auf dem **BACTEC 460TB**-Gerät getestet werden, um Fläschchen mit hohem Leerwert (GI 20) zu eliminieren und eine mit CO₂ angereicherte Atmosphäre im Fläschchen zu erzeugen.

12B-Medium kann als alleiniges Medium zur Isolierung von Mykobakterien verwendet werden. Für eine maximale Ausbeute können jedoch zusätzlich zum 12B-Fläschchen ein Röhrchen Löwenstein-Jensen-Medium bzw. Modifikationen davon oder 7H10- bzw. 7H11-Medium (übliche oder zweigeteilte Platte) inokuliert werden.¹³ Die Entscheidung, ob nur 12B-Medium oder zusätzlich ein anderes Medium bzw. andere Medien herangezogen werden, ist aufgrund der Erfahrungen des jeweiligen Labors und veröffentlichter Daten zu treffen.^{4-7,14,15}

Eine Kontamination kann möglicherweise durch Zusatz einer Antibiotika-Mischung vor der Inokulation vermindert werden.¹⁶ **PANTA** Supplement enthält Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlocillin und ist in lyophilisierter Form erhältlich (Einzelheiten siehe Produkt- und Verfahrenshandbuch für das **BACTEC 460TB**-System). Die Inokulation der Probe muss innerhalb von zwei Stunden nach Zugabe von **PANTA** zum 12B Medium-Fläschchen erfolgen. Reconstituting Fluid (RF) enthält die wachstumsfördernde Substanz POES (Polyoxyethylenstearat).¹⁷ Wird kein **PANTA** zugesetzt, empfiehlt es sich, dem 12B-Medium vor der Inokulation der Probe 0,1 mL RF zuzugeben.

Mit Hilfe einer frischen sterilen Spritze mit fest eingesetzter Kanüle oder **Luer-Lok**-Kegel für jede Probe 0,5 mL des gut gemischten Probenkonzentrats in ein 12B Medium-Fläschchen inokulieren. Ein größeres Volumen beeinträchtigt den pH-Wert des Mediums aufgrund des hohen pH-Werts des Inokulums. Proben, die aseptisch entnommen und nicht dekontaminiert wurden, können jedoch mit bis zu 1,0 mL inokuliert werden. Größere Volumina verdünnen das Medium zu sehr und können das Wachstum beeinflussen.

Das Gummiseptum jedes Fläschchens muss nach der Inokulation oder nach Entnahme von aliquotenen Mengen aus inokulierten Fläschchen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel desinfiziert und anschließend mit 70%igem Alkohol gereinigt werden.

Inokulierte Fläschchen sollten bei einer Temperatur von 37 ° ± 1 °C ohne Schütteln bebrütet und auf einem **BACTEC 460TB**-Gerät mit einer CO₂-Konzentration in Luft von 5 bis 10 % getestet werden. Während der ersten beiden Wochen die Fläschchen alle zwei bis drei Tage testen, danach einmal pro Woche für eine Gesamtdauer von sechs Wochen. Der Testplan kann je nach Arbeitsanfall des Labors variieren.

Besteht der Verdacht, dass eine Probe Mykobakterien enthält, deren optimale Temperatur nicht bei 37 °C liegt (die optimale Temperatur für *M. marinum* und *M. chelonae* beträgt z.B. 30 °C), sollten zwei Gruppen von Medien beimpft werden, wobei ein Satz bei 37 °C und der andere bei einer geeigneteren Temperatur inkubiert wird.

Von **BACTEC 12B** Medium-Fläschchen mit einem GI-Wert von 50 – 100 einen Ausstrich anfertigen. Wenn der Ausstrich positiv für säurefeste Bakterien ist, die Kultur als positiv (Identifizierung anstehend) berichten. Eine Subkultur auf einem festen Medium anlegen. Die Subkultur bei 37 ° ± 1 °C inkubieren.

TB-Differenzierung: Wenn ein 12B Medium-Fläschchen einen GI-Wert von 50 erreicht, einen **BACTEC** NAP-Test unter Anwendung des empfohlenen Verfahrens durchführen. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich der TB-Komplex von anderen, nichttuberkulösen Mykobakterien (MOTT) unterscheiden.

Die Artenbestimmung von Mykobakterien sollte nach den von der CDC empfohlenen, herkömmlichen Verfahren durchgeführt werden.³

Subkultivierung: Vor der Probenentnahme, Subkultivierung oder Färbung das Fläschchen aufrecht stellen und das Septum mit einem Alkoholtupfer abdecken. Zur Entlüftung Alkoholtupfer und Septum mit einer sterilen Kanüle mit passendem Filter oder kleiner Kompressen durchstechen. Nach Entweichen des Überdrucks und vor der Probenentnahme für Subkulturen sollte die Entlüftungsnaedel entfernt werden. Das Einstechen und Zurückziehen der Kanüle sollte mit einer geradlinigen Bewegung ohne Drehungen ausgeführt werden.

Arzneimittlempfindlichkeitsprüfung: Eine Arzneimittelempfindlichkeitsprüfung für *M. tuberculosis* kann bei einem GI-Wert von 300 + 1 zusätzlichen Inkubationstag oder bei einem GI-Wert von ≥50 angesetzt werden (Einzelheiten sind dem Produkt- und Verfahrenshandbuch für das **BACTEC 460TB**-System zu entnehmen).

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Fläschchen dürfen **NICHT** nach dem Verfallsdatum **VERWENDET** werden.

Fläschchen, die Sprünge oder Beschädigungen aufweisen, dürfen **NICHT VERWENDET** werden; Fläschchen ordnungsgemäß entsorgen.

Qualitätskontrollzertifikate sind jedem Karton mit Medien beigelegt. Diese Zertifikate geben die verwendeten Testorganismen an, einschließlich der in den NCCLS-Normen *Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media* angegebenen ATCC-Kulturen.¹⁸

Als Teil des täglichen Wartungsplans sollten Funktionstest-Fläschchen (**BACTEC** Performance Test Kit) auf dem **BACTEC**-Gerät getestet werden. Wenn niedrige Werte erhalten werden, die Funktionstest-Fläschchen jedoch korrekt getestet wurden, kann dies ein Hinweis auf mögliche Gerätestörungen sein (siehe **BACTEC** PTK-Packungsbeilage, PP-046JAA).

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie den Standard-

Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Es wird empfohlen, die korrekten Qualitätskontrollverfahren den geltenden NCCLS-Richtlinien und CLIA-Bestimmungen zu entnehmen.

ERGEBNISSE

Das Gerät zeigt den GI-Wert direkt auf einer Skala über einen Bereich von 0 – 999 an. Berechnungen sind nicht erforderlich. Der Wachstumsindex ist eine Maßeinheit für die in die Ionisierungskammer abgegebene ¹⁴CO₂-Aktivität und direkt proportional zum Wachstum im Fläschchen.

Derzeitig in den USA gültige Bestimmungen (CLIA '88) erfordern die Zuordnung von Geräteausdrucken und zugehörigen Patientenproben. Diese Ausdrücke müssen mindestens zwei Jahre lang aufbewahrt werden. Geltende regionale oder landesweite Bestimmungen können ggf. strenger sein: zusätzliche Konformitätsanforderungen sind diesen Bestimmungen zu entnehmen.

Erreicht eine Kultur einen GI-Wert von 10 oder höher, ist sie als „vermutlich H-positiv“ zu bewerten und das Fläschchen sollte täglich abgelesen werden. Ein Ausstrich für säurefeste Bakterien ist zur Bestätigung der Anwesenheit von Mykobakterien wichtig. Werden säurefeste Bakterien im Ausstrich aus einem positiven Fläschchen bestätigt, ist die Probe als positiv für säurefeste Bakterien (Identifizierung anstehend) zu berichten. Negative Kulturen werden nach sechswöchiger Inkubation berichtet.

Die Nachweiszeit für eine positive Kultur variiert erheblich und hängt von Faktoren wie der Art der Probe, der Zahl der in der Probe vorliegenden Organismen, dem Behandlungsstatus des Patienten und der Inkubationstemperatur ab. Verfahrensunterschiede, besonders die Dekontaminationsmethode, können ebenfalls die Nachweiszeit entscheidend beeinflussen. Die durchschnittliche Nachweiszeit für *M. tuberculosis* in klinischen Proben (im Ausstrich negativ oder positiv) beträgt 7 bis 12 Tage. MOTT-Bakterien werden im Allgemeinen 2 bis 3 Tage früher als *M. tuberculosis* nachgewiesen.^{4,6,7,14,15}

Die Kontaminationshäufigkeit variiert von Labor zu Labor und hängt von der Dekontaminationsmethode ab. Im 12B-Medium liegt die Kontaminationsrate meistens unterhalb der in üblichen Medien beobachteten Werte, wo Werte bis zu 5 % akzeptabel sind. Ein Kontaminationsprotokoll führen und die Kontaminationsrate regelmäßig berechnen. Das Verarbeitungsprotokoll überprüfen und, falls erforderlich, ändern. Ein kontaminiertes 12B Medium-Fläschchen kann erneut verarbeitet werden; das entsprechende Verfahren entnehmen Sie bitte dem Produkt- und Verfahrenshandbuch für das BACTEC 460TB-System.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Eine Kontamination der Probe während der Probenentnahme oder der Inokulation in das BACTEC-Fläschchen muss vermieden werden. Eine kontaminierte Probe ergibt einen positiven Wert ohne klinische Relevanz. Eine entsprechende Beurteilung muss vom Anwender auf der Basis von Faktoren wie der Art des isolierten Organismus, dem Vorkommen desselben Organismus in mehreren Kulturen, der Patientenanamnese sowie geeigneter Geräteüberprüfung usw. vorgenommen werden. Eine Kontamination kann auch durch unsachgemäße Wartung der BACTEC-Kanülen und -Schläuche, durch unzureichende Reinigung des Septums oder durch eine Störung im BACTEC-Kanülenheizer verursacht werden.

Der GI-Wert reflektiert die Vermehrungsrate und das Gesamtwachstum im Medium, kann aber nicht in gleicher Weise wie das Auszählen von Kolonien auf gewöhnlichen festen Medien quantitativ ausgewertet werden. Koloniemorphologie und Pigmentationseigenschaften können nur auf festen Medien bestimmt werden.

Der Anwender sollte sich der Möglichkeit unterschiedlicher Ergebnisse beim Nachweis bestimmter Keime bewusst sein. Dies ist auf die Natur der in Kulturmedien enthaltenen biologischen Stoffe und auf die natürliche Variabilität von Mikroorganismen zurückzuführen.

LEISTUNGSMERKMALE

In einer von Tortoli et al. durchgeführten Studie wurde die Isolierung von Mykobakterien mit zwei automatischen und einem manuellen System verglichen. Das BACTEC 460-System in Kombination mit 12B Mycobacteria Medium erzielte mit 201 Isolaten verglichen mit dem BACTEC MGIT 960-System mit 190 Isolaten und dem Löwenstein-Jensen-Medium mit 167 Isolaten. Die durchschnittliche Nachweiszeit mit dem BACTEC 460-System und 12B Medium betrug 14,8 Tage.¹⁹

TABELLE 1. Isolierung von Mykobakterien mit individuellen Systemen und Kombinationen von Systemen^a

Mycobacterium oder Probe	Gesamtzahl (%) der Isolate					
	Alle Medien	BACTEC MGIT 960-System	BACTEC 460-System	Löwenstein-Jensen- Medium	BACTEC MGIT 960-System Löwenstein-Jensen- Medium	BACTEC 460-System Löwenstein-Jensen- Medium
Alle	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
<i>M. tuberculosis</i> -Komplex	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
<i>M. avium</i> -Komplex	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Andere MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Ausstrich positiv	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Ausstrich negativ	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a Häufiger vorkommende Taxa sowie im Ausstrich positive und negative Proben wurden separat berücksichtigt.

^b MOTT, nichttuberkulöse Mykobakterien.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr.	Beschreibung
442004	BACTEC 12B Medium, 4 mL, 100 pro Karton
444764	BACTEC PANTA Plus Kit, lyophilisierter Antibiotika-Zusatz (PANTA), 5 Fläschchen; Reconstituting Fluid, 10 mL, 5 Fläschchen
442103	BACTEC NAP Differentiation Kit, 5 µg NAP pro Fläschchen, 10 Fläschchen pro Karton
445203	BACTEC 460TB System Instrument
442102	BACTEC SIRE Drug Kit (100 Tests)
442104	BACTEC Diluting Fluid (10 Tests)
442146	Isoniazid, 1 Fläschchen
442139	PZA Test Medium (5 Tests)
442143	PZA Drug/Reconstituting Fluid (50 Tests)

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.

BD BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

Italiano

USO PREVISTO

Il terreno di coltura qualitativo per micobatteri **BACTEC** 12B è raccomandato per la coltura e il ricupero dei micobatteri da campioni clinici come espettorato, aspirato gastrico, urina, tessuto, campioni mucopurulenti, altri fluidi corporei e altre secrezioni delle vie respiratorie. È consigliato anche per differenziare il complesso *Mycobacterium tuberculosis* dagli altri micobatteri e per determinare la sensibilità agli antibiotici per *M. tuberculosis*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La tecnica radiometrica **BACTEC** viene ampiamente usata per il rapido ricupero di micobatteri da espettorato e da altri campioni clinici.¹⁻⁴ Per effettuare l'isolamento primario secondo il metodo **BACTEC**, tutti i campioni clinici, sia di tipo polmonare che extra polmonare, possono venir preparati in modo simile a quello utilizzato per i metodi tradizionali.^{2,5-7} I dettagli sono forniti nel Manuale dei CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention), "Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacteria".³

Il campione da analizzare viene inoculato in uno o più flaconi di terreno per micobatteri 12B, e viene quindi incubato. Per l'inoculazione viene usata una siringa, il cui ago viene fatto penetrare attraverso il setto di gomma del flacone. Periodicamente i flaconi di coltura vengono posti nel sistema **BACTEC** 460TB per l'analisi, la quale consiste nell'aspirazione del gas sovrastante il terreno per determinarne il contenuto radioattivo. Una lettura positiva indica la presenza di microrganismi vivi nel flacone.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il terreno per micobatteri **BACTEC** 12B è un brodo base Middlebrook 7H9 arricchito. Se sono presenti dei microrganismi nel campione inoculato nel flacone **BACTEC**, questi utilizzano un substrato marcato con ¹⁴C (acido grasso) presente nel terreno ed emettono ¹⁴CO₂ nell'atmosfera al di sopra del terreno. Quando i flaconi vengono analizzati con lo strumento del sistema **BACTEC** 460TB, il gas presente nel flacone viene aspirato e il suo contenuto di ¹⁴CO₂ radioattivo viene quantificato numericamente su una scala da 0 a 999. Queste cifre costituiscono i valori dell'indice di crescita (GI). I valori GI vengono visualizzati dallo strumento **BACTEC** 460TB e stampati insieme ai numeri d'identificazione del rack e del flacone (100 unità GI rappresentano circa 0,025 µCi). L'aumento giornaliero dei valori GI è direttamente proporzionale al numero e al tasso di crescita dei batteri nel terreno.

Se si introduce nel terreno un agente inibitore, l'inibizione del metabolismo viene indicata da una riduzione della produzione di ¹⁴CO₂ rispetto a quella di un campione di controllo senza agente inibitore. Questo principio di base viene applicato nei test di sensibilità ai farmaci e nella differenziazione del complesso *M. tuberculosis* dagli altri micobatteri.

Lo strumento **BACTEC** 460TB deve essere usato con una speciale cappa TB quando lo si impiega per usi micobatteriológicos. La cappa TB fornisce aria aspirata e trattata da un filtro HEPA e assicura una pressione negativa nell'area del test. La cappa TB è inoltre dotata di una fonte di luce UV nell'area del test. L'unità è stata concepita appositamente per l'esecuzione automatica dell'analisi su flaconi e non va usata per l'inoculazione o per l'esecuzione della subcoltura in luogo di una cella biologica.

REAGENTI

Prima di essere impiegati, i flaconi di terreno **BACTEC 12B** contengono i seguenti reagenti.

Quantità aggiunta per litro d'acqua purificata	
Brodo 7H9	4,7 g
Idrolisato di caseina	1,0 g
Albumina di siero bovino	5,0 g
Catalasi	48.000 unità
Substrato al ¹⁴ C	1.000 µCi

La composizione può essere stata modificata per soddisfare i requisiti di rendimento desiderati.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Questo prodotto contiene gomma naturale secca.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle linee guide dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁸⁻¹¹

Tutte le procedure, compreso il trattamento dei campioni, la preparazione degli strisci, dell'inoculo, delle diluizioni, l'inoculazione dei terreni, la subcoltura, ecc., vanno eseguite in un'apposita camera di sicurezza biologica dotata di sistema di ventilazione idoneo, come raccomandato dai CDC.³ Indossare indumenti protettivi, mascherina e guanti durante la manipolazione di campioni e colture potenzialmente contenenti agenti patogeni. Seguire le raccomandazioni CDC e OSHA (U.S. Occupational Safety and Health Administration).

I flaconi vanno esaminati prima dell'uso, per verificare che non presentino tracce di danneggiamento, deterioramento o contaminazione, come torbidità, o setto rigonfio o incavato. **NON USARE** flaconi che presentano segni di contaminazione. Un flacone contaminato può avere pressione positiva. La contaminazione del flacone può non essere apparentemente visibile.

I flaconi che presentano torbidità, contaminazione o alterazione di colore (colore più scuro) non vanno usati. I flaconi che risultano danneggiati devono essere eliminati prima dell'inoculazione. In rare occasioni, il collo del flacone di vetro potrebbe essere incrinato, rompendosi al momento della rimozione del tappo o durante la manipolazione. Inoltre, in occasioni altrettanto rare, un flacone potrebbe essere stato sigillato in modo imperfetto. In entrambi i casi esiste la possibilità che il contenuto del flacone possa gocciolare o fuoriuscire, specialmente se il flacone viene capovolto. Se il flacone è stato inoculato, bisogna trattare il gocciolamento o la fuoriuscita con cautela, poiché potrebbero essere presenti agenti/organismi patogeni. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi inoculati prima di eliminarli.

Flaconi positivi usati per subcolture, colorazioni, ecc.: prima di effettuare il campionamento, è necessario dar sfogo al gas accumulato a seguito del metabolismo microbico. Inoculazione e prelievo vanno eseguiti, se possibile, in una camera di sicurezza biologica, indossando appropriati indumenti protettivi, inclusi maschere e guanti. Per ulteriori informazioni sulla procedura di subcoltura, vedere la sezione **Procedura**.

Per ridurre al minimo il rischio di perdite durante l'inoculazione dei campioni nei flaconi di coltura, usare siringhe con ago fisso o munite di puntali **Luer-Lok** saldamente innestati.

Il setto di gomma del flacone va disinfettato ogni volta che viene penetrato. Pulire il tappo di ogni flacone con disinfettante, quindi con alcol al 70%. Usare un disinfettante apposito per pulire l'area di lavoro, il setto del flacone e le altre superfici. I CDC dichiarano: "Dato il grande numero di disinfettanti disponibili in commercio, è importante consultare il foglietto illustrativo del prodotto per accertarsi che il disinfettante sia dotato di azione battericida contro i micobatteri".¹²

Lavorare con ago e siringa richiede particolare attenzione e l'uso di precauzioni di sicurezza. Usare siringhe con ago fisso o munite di puntali **Luer-Lok** saldamente innestati. Maneggiare la siringa con la dovuta attenzione. Non rimettere il cappuccio di protezione sull'ago dopo l'uso. Eliminare le siringhe in un contenitore per oggetti taglienti, che va a sua volta trattato con l'opportuna cautela. Consultare la direttiva M29 dell'NCCLS (U.S. National Committee for Clinical Laboratory Standards), "Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections".⁸

Istruzioni per la conservazione

I flaconi di terreno per micobatteri **BACTEC 12B** vanno conservati a 2 – 25 °C, in luogo asciutto.

I flaconi di terreno rimangono stabili fino alla data di scadenza riportata se conservati secondo le condizioni indicate.

La prassi corretta impone la segregazione del materiale radioattivo in un armadietto accessibile solo al personale autorizzato. L'armadietto deve recare l'apposita targhetta: "Attenzione: materiale radioattivo".

Non esporre il terreno a luce diretta intensa. Effettuare sempre un test iniziale di ogni flacone 12B con lo strumento **BACTEC 460TB** per stabilire un'atmosfera di CO₂ pari al 5 – 10% all'interno del flacone e per eliminare i flaconi con letture di fondo elevate. Vanno scartati i flaconi che evidenziano un valore GI pari o superiore a 20 alla prima lettura.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il prelievo e il trattamento dei campioni devono essere effettuati secondo le procedure standard descritte nel manuale CDC³ e nel Manuale dei prodotti e dei procedimenti del sistema **BACTEC 460TB (MA-0029)**.

PROCEDURA

Materiali forniti

BACTEC 12B Medium

Materiali richiesti ma non forniti

BACTEC PANTA PLUS Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

Strumento **BACTEC 460TB**

Siringa per tubercolina con ago fisso

Soluzione disinfettante

Alcol isopropilico al 70%

Ago sterile con filtro

Trattamento dei campioni: vari procedimenti per la digestione e la decontaminazione sono stati consigliati e vengono applicati nei diversi laboratori. È noto che alcuni procedimenti sono compatibili solo con terreni a base d'uovo e non sono adatti al metodo **BACTEC**. I metodi basati su idrossido di sodio (NaOH) e su N-acetil-L-cisteina-NaOH (NALC) sono raccomandati per l'uso col sistema **BACTEC 460TB**. Altri metodi possono essere compatibili colla procedura **BACTEC**, ma non sono disponibili dati sufficienti per dimostrarlo in modo conclusivo.

Per i campioni prelevati in modo asettico non è richiesto il procedimento di decontaminazione. Per ulteriori dettagli, consultare il Manuale dei prodotti e dei procedimenti del sistema **BACTEC 460TB**.

Inoculazione del terreno 12B: prima dell'inoculazione, togliere il tappo dal flacone **BACTEC** e controllare che non vi sia alcuna incrinatura, contaminazione, eccessiva torbidità e che il setto non sia rigonfio o incavato. **NON USARE** il flacone se viene notato un difetto qualsiasi.

Effettuare sempre un test iniziale di ogni flacone di terreno 12B con lo strumento **BACTEC 460TB** per eliminare i flaconi con valori di lettura di fondo elevati (GI 20) e per stabilire un'atmosfera arricchita di CO₂ all'interno del flacone.

Il terreno 12B può essere utilizzato come terreno unico per il ricupero dei micobatteri. Tuttavia, per ottenere un tasso di ricupero massimo, si possono inoculare simultaneamente al flacone 12B anche una provetta di Lowenstein-Jensen (LJ), o di un terreno LJ modificato o una piastra regolare (o doppia) di terreno 7H10/7H11.¹³ La decisione di usare il terreno 12B da solo o unitamente ad altri terreni tradizionali deve essere presa sulla base dell'esperienza e delle esigenze del singolo laboratorio e dopo aver consultato le pubblicazioni in merito.^{4,7,14,15}

La contaminazione può venire ridotta arricchendo il terreno con una miscela di antibiotici prima dell'inoculazione.¹⁶ Il supplemento **PANTA** contenente polimixina B, anfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim e azlocillina, è disponibile in forma liofilizzata (vedere il Manuale dei prodotti e dei procedimenti **BACTEC 460TB** per i dettagli). L'inoculazione dei campioni deve essere effettuata entro 2 ore dall'aggiunta del supplemento **PANTA** al flacone di terreno 12B. Il fluido ricostitutivo (RF) contiene POES (poliossietilene stearato)¹⁷, una sostanza che stimola la crescita. Perciò, nel caso in cui il **PANTA** non venisse utilizzato, si raccomanda di aggiungere 0,1 mL di solo RF al terreno 12B prima di inoculare il campione.

Usando per ogni campione una siringa sterile nuova con ago fisso o munita di puntale **Luer-Lok**, inoculare 0,5 mL di campione concentrato, ben mescolato, in ogni flacone di terreno 12B. A causa del pH elevato del campione, un volume d'inoculazione maggiore rischia di sbilanciare il pH del terreno. Tuttavia, nel caso di campioni prelevati in modo asettico e non decontaminati, si può inoculare fino a 1,0 mL nel flacone. Volumi superiori a 1,0 mL diluiscono il terreno e possono influire sulla crescita.

Dopo aver inoculato o dopo aver prelevato delle aliquote da un flacone inoculato, disinfettare il setto di gomma con un disinfettante adatto, quindi pulirlo con un tampone imbevuto d'alcol al 70%.

I flaconi inoculati vanno incubati a 37 ± 1 °C, senza agitarli, e vanno analizzati tramite uno strumento **BACTEC 460TB** usando CO₂ al 5 – 10% in aria. Testare i flaconi ogni due o tre giorni durante le prime due settimane e successivamente una volta alla settimana, per un totale di sei settimane di lettura. Gli orari di lettura possono variare a seconda del carico di lavoro di un laboratorio.

Se si sospetta che un campione contenga micobatteri che richiedono una temperatura d'incubazione ottimale diversa da 37 °C, (per es. *M. marinum* e *M. chelonae* richiedono l'incubazione a 30 °C), si devono inoculare due serie di flaconi di coltura, di cui una per l'incubazione a 37 °C e l'altra per incubazione alla temperatura ritenuta ottimale.

Preparare uno striscio a partire da un flacone di terreno **BACTEC 12B** quando il GI è ad un valore tra 50 e 100. Se lo striscio è positivo per i bacilli acido-resistenti (BAR), considerare la cultura positiva, in attesa d'identificazione. Eseguire una subcoltura su terreno solido. Incubare la subcoltura a 37 ± 1 °C.

Differenziazione del complesso TB: quando il GI di un flacone di terreno 12B raggiunge un valore di 50, allestire il test **BACTEC NAP** seguendo il metodo raccomandato. Questa procedura differenzia il complesso TB dai micobatteri non tubercolari (Mycobacteria Other Than Tuberculosis, o MOTT).

L'identificazione della specie micobatterica va effettuata secondo i metodi convenzionali, come raccomandato dagli U.S. Centers for Disease Control and Prevention.³

Subcoltura: prima di effettuare un prelievo, una subcoltura o una colorazione, porre il flacone in posizione verticale e collocare un tampone imbevuto d'alcol sul suo setto. Per ridurre la pressione all'interno del flacone, inserire un ago sterile munito di filtro appropriato o di compressa attraverso il tampone e il setto. L'ago va rimosso non appena la pressione diminuisce e prima di eseguire il prelievo del campione per la subcoltura. L'inserimento e la rimozione dell'ago devono essere eseguiti con movimento lineare, evitando torsioni.

Prova di sensibilità ai farmaci: se il GI raggiunge un valore di 300, incubare ancora per un giorno, quindi allestire una prova di sensibilità agli antibiotici per *M. tuberculosis*; quando il GI è ≥ 500 la prova può essere allestita nello stesso giorno (per dettagli vedere il Manuale dei prodotti e dei procedimenti del sistema BACTEC 460TB).

CONTROLLO DI QUALITÀ

NON USARE i flaconi oltre la data di scadenza riportata.

NON USARE flaconi che presentano incrinature o difetti; eliminare il flacone nel modo appropriato.

Certificati di controllo qualità sono forniti con ciascuna confezione. I certificati di controllo qualità indicano gli organismi del test, comprese le colture ATCC specificate nello standard NCCLS, *Quality Assurance for Commercially Prepared Culture Media*.¹⁸

Nel quadro del programma quotidiano di controllo, è necessario analizzare i flaconi di verifica del rendimento (BACTEC Performance Test Kit, Kit di verifica del rendimento) con lo strumento BACTEC 460TB. Se si ottengono valori bassi di lettura anche quando i flaconi di verifica del rendimento sono stati analizzati correttamente, è probabile che il funzionamento dello strumento sia difettoso (vedere il foglietto illustrativo PP-046JAA incluso nella confezione BACTEC PTK).

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditamento e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alle prassi di controllo di qualità appropriate, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione NCCLS in merito.

RISULTATI

Lo strumento effettua una lettura diretta, su una scala da 0 a 999 denominata indice di crescita. Non è richiesto alcun calcolo. L'indice di crescita è una misura della quantità di ¹⁴CO₂ radioattivo aspirato nella camera a ioni. Esso è direttamente proporzionale al tasso di crescita presente nel flacone.

Negli Stati Uniti, le attuali normative federali (CLIA '88) richiedono che i risultati stampati dallo strumento siano sempre associati al campione clinico appropriato. Questi stampati devono essere conservati per un periodo di almeno due anni. Le normative locali o statali possono essere più restrittive di quelle federali: si prega perciò di consultare tali normative per identificare eventuali requisiti supplementari di conformità.

Se il GI raggiunge un valore di 10 o più, la coltura deve essere considerata come "presunta H positiva" e il flacone va testato quotidianamente. Lo striscio BAR è importante per la conferma della presenza di micobatteri. Se si riscontra la presenza di BAR in uno striscio eseguito da un flacone positivo, il campione può essere considerato come coltura BAR positiva (in attesa d'identificazione). Le colture negative devono essere determinate come tali dopo sei settimane di incubazione.

Il tempo necessario per rilevare una coltura positiva varia considerevolmente in funzione di fattori quali il tipo di campione, la concentrazione di organismi presente nel campione, il tipo di terapia somministrata al paziente e la temperatura d'incubazione. Le differenze procedurali, specialmente per quanto riguarda il metodo di decontaminazione, possono giocare un ruolo importante relativamente al tempo di rilevamento richiesto. Un periodo di 7 – 12 giorni è considerato come il tempo di rilevamento medio per *M. tuberculosis* nei campioni clinici (con strisci positivi e strisci negativi). I bacilli non tubercolari (MOTT) vengono generalmente isolati due o tre giorni prima di *M. tuberculosis*.^{4,6,7,14,15}

Il tasso di contaminazione varia da un laboratorio all'altro, a seconda del metodo di decontaminazione usato. Il tasso di contaminazione dei flaconi di terreno 12B è di solito più basso di quello osservato di norma nei terreni tradizionali, in cui è accettabile un tasso di contaminazione fino al 5%. Si raccomanda di conservare documentazione della contaminazione e di calcolare periodicamente il tasso di contaminazione. Rivedere il protocollo procedurale e, se necessario, apportarvi le opportune modifiche. Un flacone di terreno 12B contaminato può venir nuovamente trattato; consultare il Manuale dei prodotti e dei procedimenti BACTEC 460TB per la procedura adeguata.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Fare attenzione a non contaminare il campione durante il prelievo e l'inoculazione nel flacone BACTEC. Un campione contaminato darà una lettura positiva, senza rilevanza clinica. L'utilizzatore dovrà determinare la causa della contaminazione considerando fattori quali il tipo di organismo recuperato, la presenza dello stesso organismo in più colture, l'anamnesi del paziente, le opportune verifiche delle attrezzature, ecc. La contaminazione può essere dovuta anche alla manutenzione scorretta degli aghi BACTEC e dei tubi, alla pulizia inadeguata del setto o al malfunzionamento dell'unità di riscaldamento dell'ago BACTEC (vedere il Manuale d'uso e manutenzione BACTEC 460TB).

Il valore GI riflette la concentrazione dei batteri e il loro tasso di crescita nel terreno; tuttavia questi valori non possono essere quantificati esattamente come può essere fatto con la conta delle colonie su un terreno solido. La morfologia delle colonie e le loro caratteristiche di pigmentazione possono essere determinate solamente su terreni solidi.

A causa della natura del materiale biologico nei terreni di coltura e l'inerente variabilità degli organismi, l'utilizzatore deve essere consapevole che i risultati di recupero di certi microrganismi possono subire variazioni.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Nel contesto di uno studio condotto da Tortoli et al., il recupero dei micobatteri è stato messo a confronto in due sistemi automatizzati e in un sistema manuale. Con il sistema BACTEC 460 con terreno di coltura per micobatteri 12B si sono ottenuti 201 isolati, in confronto a 190 isolati ottenuti con il sistema BACTEC MGIT 960 e 167 isolati con il terreno Lowenstein-Jensen. Il tempo medio di rilevamento mediante il sistema BACTEC 460 e il terreno 12B è stato di 14,8 giorni.¹⁹

TABELLA 1. Ricupero di micobatteri mediante sistemi singoli e combinazioni di sistemi^a

Micobatterio o campione	N. totale (%) ricuperato					
	Tutti i terreni	Sistema BACTEC MGIT 960	Sistema BACTEC 460	Terreno Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC MGIT 960 + terreno Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC 460 + terreno Lowenstein-Jensen
Tutti	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
Complesso <i>M. tuberculosis</i>	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
Complesso <i>M. avium</i>	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Altro MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Striscio positivo	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Striscio negativo	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a Le unità tassonomiche presenti più di frequente sono considerate separatamente, come pure i campioni con striscio positivo e con striscio negativo.

^b MOTT, micobatteri diversi da *M. tuberculosis*.

DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
442004	BACTEC 12B Medium, 4 mL, 100 per confezione
444764	BACTEC PANTA Plus Kit, supplemento antibiotico liofilizzato (PANTA), 5 flaconi; fluido ricostitutivo, 10 mL, 5 flaconi
442103	BACTEC NAP Differentiation Kit, 5 µg di NAP per flacone, 10 flaconi per confezione
445203	BACTEC 460TB System Instrument
442102	Kit del farmaco SIRE BACTEC (100 test)
442104	Fluido di diluizione BACTEC (10 test)
442146	Isoniazide, 1 flacone
442139	Terreno di coltura PZA (5 test)
442143	Farmaco PZA/fluido ricostitutivo (50 test)

BIBLIOGRAFIA - Vedere "References" nel testo inglese.

BD BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O BACTEC 12B Mycobacteria Medium (Meio de Micobactérias BACTEC 12B) é recomendado para a cultura e isolamento de micobactérias oriundas de amostras clínicas, escarro, amostras gástricas, urina, tecidos, amostras mucopurulentas, outros fluidos corporais e outras secreções respiratórias. É também recomendado para a diferenciação do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* de outras micobactérias e para realização de testes de sensibilidade da *M. tuberculosis*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Técnica Radiométrica BACTEC foi amplamente utilizada para o isolamento rápido de micobactérias do escarro e outras amostras clínicas.¹⁻⁴ Todos os tipos de amostras clínicas, incluindo a pulmonar e extra-pulmonar, podem ser processadas pelo isolamento primário BACTEC, de uma forma semelhante aos procedimentos convencionais.^{2,5-7} São fornecidos mais detalhes no Manual CDC – Procedimento para o Isolamento e Identificação de Micobactérias.³

A amostra a ser analisada é inoculada dentro de um ou mais frascos com Meio de Micobactérias 12B, com o auxílio de uma seringa através do septo de borracha, e incubada. O frasco da cultura é colocado periodicamente no instrumento BACTEC 460TB para a realização de testes, que consistem na aspiração do gás no topo do frasco e o ensaio do seu conteúdo radioativo. Uma leitura positiva indica a presença de microorganismos viáveis no frasco.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O **BACTEC 12B Mycobacteria Medium** é um meio líquido enriquecido Middlebrook 7H9. Se estiverem presentes microorganismos na amostra inoculada no frasco **BACTEC**, utiliza-se um substrato marcado com ^{14}C (ácido gordo) presente no meio e libertam $^{14}\text{CO}_2$ para a atmosfera acima do meio. Quando os frascos são analisados no Sistema **BACTEC 460TB**, o gás é aspirado do frasco e a radioactividade da $^{14}\text{CO}_2$ é determinada quantitativamente em termos de números, numa escala de 0 a 999. Estes números são designados por Índice de Crescimento (GI). Os números GI são exibidos pelo Sistema **BACTEC 460TB** e também são impressos juntamente com a identificação do bloco e os números dos frascos (100 unidades GI são aproximadamente 0,025 μCi). O crescimento diário do GI é directamente proporcional à taxa e grau de crescimento no meio.

Se for introduzido um agente inibidor no meio, a inibição do metabolismo é indicada pela redução da produção de $^{14}\text{CO}_2$, quando comparado com um controlo ao qual não foi introduzido qualquer agente inibidor. Este princípio básico é aplicado para testes de sensibilidade a fármacos e na diferenciação do complexo de *M. tuberculosis* de outras micobactérias.

O Sistema **BACTEC 460TB** deve ser usado com uma câmara especial TB, quando for usado para Micobacteriologia. A câmara TB fornece ar filtrado HEPA e uma pressão negativa na área de teste. Além disso, a câmara TB está equipada com uma fonte de luz ultravioleta na área do teste. A unidade é concebida para a realização de testes automáticos nos frascos e não pode ser usada para inoculação ou repicagem, em substituição de uma câmara biológica.

REAGENTES

Antes do processamento, os frascos de cultura **BACTEC 12B** contêm os seguintes ingredientes reactivos:

Quantidade adicionada por Litro de Água Processada	
Meio líquido 7H9	4,7 g
Hidrolisado de Caseína	1,0 g
Albumina sérica de bovino	5,0 g
Catalase	48.000 unidades
Substrato ^{14}C	1.000 μCi

A composição pode ter sido ajustada para cumprir exigências de desempenho específicas.

Advertências e Precauções:

Para diagnóstico *in vitro*.

Este produto contém borracha natural desidratada.

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o Vírus da Imunodeficiência Humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções Padrão"⁸⁻¹¹ e as linhas de orientação da instituição.

Realize todos os procedimentos, incluindo o processamento das amostras, preparação do esfregaço, preparação do inóculo, preparação das diluições, inoculação dos meios, repicagem, etc. numa câmara de segurança biológica adequada para o efeito, numa divisão que tenha um sistema de ventilação apropriado, como recomendado pela CDC.³ Use vestuário de protecção adequado e luvas quando manusear amostras e culturas de agentes patogénicos potenciais. Siga as recomendações da CDC e da OSHA.

Antes de ser utilizado, cada frasco deve ser examinado relativamente a sinais de danos, ou contaminação, tais como turvação, abaulamento ou depressão do septo. **NÃO UTILIZE** nenhum frasco que apresente sinais de contaminação. Um frasco contaminado pode conter uma pressão positiva. A contaminação do frasco pode não ser imediatamente aparente.

Os frascos que apresentem turvação, contaminação ou descoloração (escurecimento) não devem ser utilizados. Os frascos que apresentem sinais de danos devem ser eliminados antes da inoculação. Em raras ocasiões, o gargalo do frasco de vidro poderá estar rachado e partir-se durante a remoção da tampa de encaixe, ou durante a manipulação. Igualmente, em ocasiões raras, um frasco poderá não se encontrar suficientemente selado. Em ambos os casos, poderá ocorrer uma fuga ou o derrame do conteúdo do frasco, especialmente se o frasco for invertido. Se o frasco tiver sido inoculado, trate a fuga ou o derrame com cuidado pois podem existir organismos/agentes patogénicos. Antes de eliminar, esterilize todos os frascos inoculados em autoclave.

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 e a inoculação deverão ser efectuadas numa câmara de segurança biológica e utilizando vestuário de protecção adequado, incluindo luvas e máscaras. Consulte a secção **Procedimento** para obter mais informações sobre a repicagem.

Para minimizar a possibilidade de fugas durante a inoculação da amostra dentro dos frascos de cultura, utilize seringas com agulhas fixas ou pontas da marca **Luer-Lok** devidamente apertadas.

O septo de borracha do frasco deve ser desinfectado cada vez que o frasco é introduzido. Limpe o topo de cada frasco com desinfectante e a seguir com álcool a 70%. Use um desinfectante apropriado para a limpeza da área de trabalho e para lavar o septo dos frascos e outras superfícies. A CDC declara: "Com tantos desinfectantes disponíveis, é importante consultar as brochuras dos produtos para se certificar se o desinfectante é bactericida para as micobactérias".¹²

O uso de seringa e agulhas requer precauções de segurança e uma atenção especial. Use seringas com agulhas fixas ou pontas de marca **Luer-Lok** devidamente apertadas. Deve manusear a seringa com o devido cuidado. Não volte a colocar a cobertura da agulha após esta ter sido utilizada. Elimine as seringas em recipientes para

objectos cortantes e manipule os recipientes com cuidado. Consulte a Diretriz M29 da NCCLS, “Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections” (Protecção dos trabalhadores de laboratórios de infeções adquiridas no local de trabalho).⁸

Instruções de armazenamento

Os frascos de Micobactérias **BACTEC 12B** devem ser conservados entre 2°C – 25°C, num local seco.

Os frascos com o Meio são estáveis nas condições de armazenamento recomendadas até à data de validade constante da etiqueta.

É uma boa prática separar os materiais radioactivos dos outros materiais, conservando-os numa câmara apenas acessível a pessoal autorizado. A câmara deve estar marcada com as palavras “Cuidado: Materiais Radioactivos”

Não exponha o meio à luz directa. Analise sempre cada um dos frascos 12B no instrumento **BACTEC 460TB** para determinar uma atmosfera de 5 – 10% CO₂ dentro do frasco e para separar os frascos com leituras de fundo muito altas. Se num exame inicial um frasco tiver uma leitura de GI 20 ou mais, deite-o fora.

COLHEITA DAS AMOSTRAS

A recolha e manuseamento das amostras devem ser realizadas de acordo com os métodos padrão, que foram devidamente revistos no manual da CDC³ e no Manual de Procedimento do Sistema **BACTEC 460TB** (MA-0029).

PROCEDIMENTO

Material fornecido:

BACTEC 12B Medium

Material necessário mas não fornecido:

BACTEC PANTA PLUS Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

BACTEC 460TB Instrument

Seringa de tuberculina com agulha permanentemente fixa

Solução desinfetante

Gaze embebida em álcool isopropílico a 70%

Agulha estéril com filtro

Processamento das amostras: Foram recomendados diversos procedimentos para digestão e descontaminação, que estão a ser cumpridos em vários laboratórios. Sabe-se que alguns procedimentos apenas são compatíveis com meios à base de ovo e não são adequados para uso com o método **BACTEC**. Os métodos com Hidróxido de Sódio (NaOH) e com N-acetil-L-cisteína-NaOH (NALC) são recomendados para o Sistema **BACTEC 460TB**. Pode haver outros métodos compatíveis com o procedimento **BACTEC**, mas não estão disponíveis dados suficientes que demonstrem de forma conclusiva essa compatibilidade.

Para as amostras recolhidas assepticamente, não é necessário qualquer procedimento de descontaminação. Para mais detalhes consulte o Manual de Procedimento e Funcionamento do Sistema **BACTEC 460TB**.

Inoculação do Meio 12B: Antes da inoculação, 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**.

Analise todos os frascos de Meio 12B no Sistema **BACTEC 460TB** para eliminar os frascos com leituras de fundo altas (GI 20) e para estabelecer uma atmosfera enriquecida em CO₂ dentro do frasco.

O Meio 12B pode ser usado como “meio isolado” para o isolamento de micobactérias. No entanto, para a recuperação máxima de micobactérias, também podem ser inoculados juntamente com o frasco 12B, um tubo de Lowenstein-Jensen (LJ), ou 7H10/7H11 (placa regular ou dupla).¹³ A decisão de usar o meio 12B sozinho ou com outros meios convencionais, deve ser tomada depois de se rever a experiência e requisitos de cada instituição, bem como os dados publicados até ao momento.^{4-7,14,15}

A contaminação pode ser reduzida suplementando o meio com uma mistura de antimicrobicos antes da inoculação.¹⁶ O Suplemento **PANTA** que contém polimixina B, anfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim e azlocilina, está disponível na forma liofilizada (ver Manual de Procedimento e Funcionamento do Sistema **BACTEC 460TB**, para mais detalhes). A inoculação da amostra deve ser realizada até 2 horas após a adição de **PANTA** no frasco do Meio 12B. O Fluido Reconstituente (FR) contém uma substância promotora do crescimento, o estearato de polioxiétileno (POES).¹⁷ Assim, recomenda-se que quando o **PANTA** não for usado, seja adicionado apenas 0,1 mL de FR ao Meio 12B, antes da inoculação da amostra.

Utilizando uma nova seringa esterilizada com agulha fixa ou ponta da marca **Luer-Lok** para cada amostra, inocule 0,5 mL do concentrado da amostra bem misturado, em cada frasco de Meio 12B. Um volume maior perturbaria o pH do meio devido ao elevado pH do inóculo. Contudo, as espécies recolhidas assepticamente e não descontaminadas, podem ser inoculadas com um máximo de 1,0 mL. Um volume acima de 1,0 mL dilui o meio e pode afectar o crescimento.

Desinfete o septo de borracha de cada frasco com um desinfetante adequado, após a inoculação ou após a amostragem de alíquotas de frascos inoculados, e em seguida limpe com uma gaze embebida em álcool a 70%.

Os frascos inoculados devem ser incubados a 37 ± 1°C sem agitar, e devem ser analisados no Sistema **BACTEC 460TB** usando 5% – 10% CO₂ no ar. Analise os frascos a cada dois ou três dias, durante as primeiras duas semanas e em seguida semanalmente, durante um total de seis semanas. A programação dos testes pode variar dependendo do trabalho que cada laboratório tem.

Se suspeitar que uma amostra contém micobactérias que requerem uma temperatura ideal diferente dos 37°C (isto é *M. marinum* e *M. chelonae* necessitam 30°C), devem ser inoculados dois conjuntos de meios, um conjunto para incubação a 37°C e o segundo conjunto para incubação à temperatura ideal.

Prepare um esfregaço a partir de um frasco de Meio **BACTEC** 12B com um Índice de Crescimento (GI) entre 50 e 100. Se for possível para AFB, registre como positivo com identificação pendente. Realize a repicagem para um meio sólido. Incube a repicagem a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Diferenciação TB: Quando um frasco de Meio 12B atingir um GI de 50, realize o teste **BACTEC NAP** seguindo os procedimentos recomendados. Este procedimento diferenciará o Complexo TB de outras micobactérias diferentes da *M. tuberculosis* (MOTT).

Deve ser realizada a especificação da micobactéria através das técnicas convencionais, tal como recomendado pelo Centro de Controlo e Prevenção da Doença.³

Repicagem: Antes de efectuar a amostragem, a repicagem, ou a coloração coloque o frasco em posição vertical e coloque uma compressa com álcool sobre o septo. Para libertar a pressão no frasco, introduza uma agulha estéril 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 e antes da recolha da amostra do frasco para repicagem. A introdução e a remoção da agulha devem ser efectuadas com um movimento em linha recta, evitando quaisquer movimentos de torção.

Testes de sensibilidade ao fármaco: Qualquer teste de sensibilidade ao fármaco para *M. tuberculosis* pode ser definido a um GI de 300 + 1 dia adicional de incubação ou com um GI ≥ 500 (ver o Manual de Procedimentos e Funcionamento do Sistema **BACTEC** 460TB, para mais detalhes).

CONTROLO DE QUALIDADE

NÃO UTILIZE os frascos que tenham ultrapassado o prazo de validade.

NÃO UTILIZE os frascos que apresentem rachas ou defeitos; elimine o frasco de forma apropriada.

Em cada caixa de meios de cultura, são fornecidos Certificados do Controlo de Qualidade. Os Certificados do Controlo de Qualidade contêm uma lista dos organismos testados, incluindo as culturas **ATCC** especificadas na Norma NCCLS, *Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.¹⁸

Como parte do programa de manutenção diário, os frascos de Teste de Desempenho (**BACTEC** Performance Test Kit) devem ser analisados no Sistema **BACTEC** 460TB. Se forem obtidas leituras baixas, apesar dos frascos de Testes de Desempenho terem sido analisados convenientemente, isto pode indicar possíveis problemas no instrumento (ver o folheto do **BACTEC** PTK, PP-046JAA).

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação locais e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as orientações NCCLS e os regulamentos CLIA relativamente às práticas de controlo de qualidade apropriadas.

RESULTADOS

O instrumento lê directamente numa escala de 0 – 999 designada por Índice de Crescimento. Não é necessário efectuar cálculos. O Índice de Crescimento é a medição da radioactividade do $^{14}\text{CO}_2$ aspirada para dentro da câmara de iões e é directamente proporcional ao grau de crescimento activo no frasco.

As actuais Regulamentações Federais (CLIA '88) exigem que as impressões dos resultados dos testes estejam associados com a correspondente amostra do doente. Estas impressões devem ser guardadas durante um período mínimo de 2 anos. As regulamentações locais ou a nível do Estado, podem ser mais restritivas do que os requisitos Federais. Consulte essas regulamentações para conhecer as exigências adicionais.

Quando o GI atinge 10 ou mais, a cultura deve ser considerada como “presumivelmente H positiva” e o frasco deve ser analisado diariamente. O esfregaço AFB é importante para a confirmação da presença de micobactérias. Logo que se observe AFB no esfregaço elaborado a partir de um frasco positivo, pode-se registar a amostra como positiva para AFB (identificação pendente). As culturas negativas devem ser reportadas após seis semanas de incubação.

O tempo de detecção de uma cultura positiva varia consideravelmente devido a factores como o tipo de amostra, o número de organismos presentes na amostra, o estado de tratamento do doente e a temperatura de incubação. As diferenças de procedimento, especialmente o método de descontaminação, podem desempenhar um papel importante no tempo de detecção. O tempo médio de detecção para o *M. tuberculosis* presente em amostras clínicas (esfregaço negativo e esfregaço positivo) é referido como sendo de 7 a 12 dias. Os bacilos MOTT são normalmente detectados dois a três dias antes do *M. tuberculosis*.^{4,6,7,14,15}

A incidência da contaminação varia de laboratório para laboratório, dependendo do procedimento de descontaminação usado. A contaminação no frasco de isolamento do Meio 12B é normalmente mais baixa do que é habitualmente observado nos meios convencionais, onde uma taxa de contaminação até 5% é aceitável. Mantenha um registo de contaminação e calcule a taxa de contaminação periodicamente. Reveja o protocolo de processamento e ajuste-o, se necessário. Um frasco de Meio 12B contaminado pode ser novamente processado. Para mais detalhes sobre o procedimento consulte o Manual de Procedimentos e Funcionamento do Sistema **BACTEC** 460TB.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Deverá tomar precauções para evitar a contaminação da amostra durante a colheita e a inoculação dentro do frasco **BACTEC**. Uma amostra contaminada apresentará uma leitura positiva, mas não indicará uma amostra positiva clinicamente relevante. Tal determinação deverá ser efectuada pelo utilizador com base em factores tais como o tipo de organismo isolado, a ocorrência do mesmo organismo em culturas múltiplas, a história do doente e as verificações do equipamento, etc. A contaminação também pode resultar de uma manutenção inadequada

das agulhas e tubos **BACTEC**, limpeza deficiente do septo ou avaria da unidade de aquecimento das agulhas **BACTEC** (Consulte o Manual de Manutenção e Funcionamento do Instrumento).

O nível do GI reflecte a taxa e grau de crescimento ocorrido no meio, mas não pode ser quantificado de forma tão precisa como o são as contagens de colónias nos meios sólidos. A morfologia e pigmentação características das colónias podem ser determinadas apenas em meios sólidos.

Devido à natureza dos materiais biológicos existentes nos produtos dos meios e à variabilidade inerente ao organismo, o utilizador deverá estar informado da potencial variação de resultados no isolamento de certos microorganismos.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Num estudo efectuado por Tortoli et al., comparou-se o isolamento de micobactérias em dois sistemas automáticos e um sistema manual. O Sistema **BACTEC 460** usando o Meio de Micobactérias 12B produziu 201 isolados, em comparação com 190 isolados obtidos com o sistema **BACTEC MGIT 960** e 167 isolados obtidos com o Meio Lowenstein-Jensen. O tempo médio de detecção utilizando o Sistema **BACTEC 460** e o Meio 12B foi de 14,8 dias.¹⁹

TABELA 1. Isolamento de micobactérias por sistemas individuais e por combinações de sistemas^a

Micobactérias ou amostra	Nº total % isolada					
	Todos os meios	Sistema BACTEC MGIT 960	Sistema BACTEC 460	Meio de Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC MGIT 960 + Meio de Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC 460 + Meio de Lowenstein-Jensen
Todos	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
Complexo <i>M. tuberculosis</i>	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
Complexo <i>M. avium</i>	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Outros MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Esfregaço positivo	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Esfregaço negativo	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a Os grupos taxonómicos que ocorrem mais frequentemente são considerados em separado, tal como o foram as amostras de esfregaço positivo e negativo.

^b MOTT, micobactérias além de *M. tuberculosis*.

APRESENTAÇÃO

Nº de Cat. Descrição

442004	BACTEC 12B Medium , 4 mL, 100 por embalagem
444764	BACTEC PANTA Plus Kit , suplemento antimicrobiano liofilizado (PANTA), 5 frascos; Fluido Reconstituente, 10 mL, 5 frascos
442103	BACTEC NAP Differentiation Kit , 5 µg NAP por frasco, 10 frascos por embalagem
445203	BACTEC 460TB System Instrument
442102	BACTEC SIRE Drug Kit (100 testes)
442104	BACTEC Diluting Fluid (10 testes)
442146	Isoniazid, 1 frasco
442139	PZA Test Medium (5 testes)
442143	BACTEC PZA Drug/Reconstituting Fluid Kit (50 testes)

BIBLIOGRAFIA: Consulte "References" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Importado e Distribuído no Brasil por:

Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda

Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil

CNPJ 21.551.379/0013-31

Serviço de Suporte Técnico (11) 5185-9961

Registro ANVISA nº 10033430293

Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555 654

BD BACTEC 12B Mycobacteria Culture Vials Middlebrook 7H12

Español

USO PREVISTO

BACTEC 12B Mycobacteria Medium (medio cualitativo **BACTEC 12B** para micobacterias) se recomienda para el cultivo y la recuperación de micobacterias a partir de muestras clínicas, esputos, secreciones gástricas, orina, tejidos, muestras mucopurulentas, y otros fluidos biológicos y secreciones respiratorias, para la diferenciación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias y para la prueba de sensibilidad a antibióticos de *M. tuberculosis*.

RESUMEN Y EXPLICACION

La técnica radiométrica **BACTEC** se ha utilizado extensivamente durante varios años para la recuperación rápida de micobacterias a partir de esputos y otras muestras clínicas¹⁻⁴. Todas las muestras clínicas tanto pulmonares como extrapulmonares pueden procesarse para el aislamiento primario **BACTEC** de manera similar a los procedimientos convencionales^{2,5-7}. Los detalles se encuentran en el manual de los CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention), Procedure for the Isolation and Identification of Mycobacteria³.

La muestra que va a ser analizada se inocula en uno o más frascos de medio 12B Mycobacteria Medium, con una jeringa a través de la membrana de goma y se incuba. El frasco de cultivo debe analizarse periódicamente en un instrumento **BACTEC 460TB**. La prueba consiste en extraer el gas del espacio por encima del medio y analizarlo para determinar su contenido radioactivo. Una lectura positiva indica la presencia de microorganismos viables dentro del frasco.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El medio para micobacterias **BACTEC 12B Mycobacteria Medium** es una base enriquecida de caldo Middlebrook 7H9. Si hay microorganismos presentes en la muestra que se inocula dentro del frasco **BACTEC**, éstos utilizarán un sustrato marcado con ¹⁴C (ácido graso) presente en el medio y desprenderán ¹⁴CO₂ a la atmósfera situada encima del medio. Cuando los frascos se analizan en el instrumento **BACTEC 460TB**, se aspira el gas del frasco y se determina cuantitativamente la radioactividad de ¹⁴CO₂, midiéndola en una escala de 0 a 999. El resultado numérico se conoce como el índice de crecimiento (IC). Los números del IC se visualizan en el instrumento **BACTEC 460TB** y se imprimen junto con los números de identificación de la gradilla y de cada frasco (100 unidades IC equivalen a unos 0,025 µCi). El incremento diario del IC es directamente proporcional al índice y a la cantidad de crecimiento en el medio.

Si se agrega un agente inhibidor al medio, la inhibición del metabolismo es evidente debido a que la producción de ¹⁴CO₂ es menor comparada con la de un medio de control sin el agente inhibidor. Este principio básico se aplica a los análisis de sensibilidad farmacológica y para diferenciar el complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias.

El instrumento **BACTEC 460TB** debe utilizarse dentro de una campana especial para tuberculosis cuando se use para micobacteriología. La campana para tuberculosis proporciona aire de escape filtrado HEPA y una presión negativa en la zona de análisis. La campana para tuberculosis está dotada además de una fuente de luz ultravioleta en la zona de análisis. La unidad está diseñada para realizar los análisis de los frascos automáticamente; no debe emplearse para efectuar la inoculación o los subcultivos en lugar de una cabina de seguridad biológica.

REACTIVOS

Antes de realizar el procesamiento, los frascos con medio **BACTEC 12B Medium** contienen los siguientes ingredientes reactivos:

Cantidad añadida por litro de agua destilada	
Caldo 7H9	4,7 g
Hidrolizado de caseína	1,0 g
Albumina de suero bovino	5,0 g
Catalasa	48.000 unidades
Sustrato con ¹⁴ C	1.000 µCi

La composición puede haberse modificado de acuerdo con los criterios específicos de rendimiento.

Advertencias y precauciones:

Para diagnóstico *in vitro*.

Este producto contiene caucho natural seco.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"⁸⁻¹¹ y las directrices del centro.

Realizar todos los procedimientos, incluido el procesamiento de las muestras, la preparación de frotis, la preparación del inóculo, la preparación de diluciones, la inoculación de los medios, los subcultivos, etc. en una

cabina de seguridad biológica situada en una habitación con un sistema de ventilación adecuado conforme a las normas de los CDC³. Usar una bata, máscara y guantes protectores al manipular las muestras y los cultivos de posibles agentes patógenos. Seguir las recomendaciones de los CDC y OSHA (U.S. Occupational Health and Safety Administration).

Se debe examinar cada frasco antes de usarlo para ver si presenta indicios de daño, deterioro o contaminación como turbidez o una membrana hinchada o hundida. **NO UTILIZAR** ningún frasco que presente indicios de contaminación. Un frasco contaminado podría contener presión positiva. Es posible que la contaminación de un frasco no se note fácilmente.

Los frascos que muestren turbidez, contaminación, decoloración u oscurecimiento no deben utilizarse. Los frascos que muestren indicios de daños deben desecharse antes de su inoculación. En raras ocasiones, el cuello del frasco puede estar rajado y puede romperse al quitar el tapón a presión o al manipular el frasco. También, en raras ocasiones, es posible que un frasco no esté bien precintado. En ambos casos, el contenido de los frascos puede gotear o derramarse, especialmente si se invierte el frasco. Si se ha inoculado el frasco, se extremarán las precauciones, ya que pueden existir organismos o agentes patógenos. Todos los frascos inoculados deben esterilizarse en autoclave antes de desecharse.

Frascos de cultivo positivo para subcultivo o para tinción, etc.: Antes de tomar una muestra de los frascos es necesario liberar el gas que puede haberse generado debido al metabolismo microbiano. La inoculación y la toma de muestras de los frascos debe efectuarse en una cabina de seguridad biológica empleando ropas adecuadas para protección, incluidos guantes y máscara. Consultar la sección **Procedimiento** para mayor información acerca de los subcultivos.

Para reducir a un mínimo la posibilidad de fugas durante la inoculación del espécimen en los frascos de cultivo, usar jeringas de aguja fija o con puntas **Luer-Lok** fijadas firmemente.

Desinfectar la membrana de goma del frasco cada vez que éste sea penetrado. Limpiar la boca de cada frasco con desinfectante y después con alcohol al 70%. Usar un desinfectante apropiado para limpiar tanto el área de trabajo como la membrana del frasco y otras superficies. Según el CDC: "Son tantos los desinfectantes disponibles, que resulta importante consultar el folleto informativo de cada producto para cerciorarse de que dicho desinfectante es bactericida para micobacterias"¹².

Cuando se trabaja con jeringas y agujas hay que prestar mucho cuidado y observar las medidas de seguridad. Usar jeringas de aguja fija o puntas **Luer-Lok** fijadas firmemente. Manipular las jeringas con precaución. No ponga poner la cubierta en una aguja usada. Desechar las jeringas en un recipiente para objetos punzantes y manejar dichos recipientes con cuidado. Consultar las recomendaciones aprobadas por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) en el documento M29, "Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards"⁸.

Instrucciones para el almacenamiento

Los frascos con medio para micobacterias **BACTEC 12B** deben almacenarse en un lugar seco, a una temperatura entre 2 y 25 °C.

Los frascos con medio son estables hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando se almacenen como se recomienda.

Es recomendable separar los materiales radioactivos almacenados en un armario accesible solamente al personal autorizado. En el armario se pondrá una etiqueta con las palabras "Precaución: material radioactivo".

No exponga exponer el medio a la luz intensa directa. Antes de usar los frascos 12B, analizar siempre cada uno con el instrumento **BACTEC 460TB** para establecer una atmósfera de 5 a 10% de CO₂ en el frasco y para descartar los frascos con lecturas de fondo altas. Si la lectura de IC de un frasco alcanza 20 o más en esta prueba inicial, debe desecharse.

EXTRACCION DE MUESTRAS

La extracción y manipulación de muestras debe efectuarse de acuerdo a los métodos estándares que han sido revisados adecuadamente en el manual de los CDC³ y en el Manual de productos y procedimientos del sistema **BACTEC 460TB** (MA-0029).

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados:

BACTEC 12B Medium

Materiales necesarios pero no suministrados:

BACTEC PANTA Plus Kit

BACTEC NAP Differentiation Kit

BACTEC 460TB Instrument

Jeringa de tuberculina de aguja fija

Solución desinfectante

Trozo de algodón empapado en alcohol isopropílico al 70%

Aguja estéril con filtro

Procesamiento de la muestra: Son numerosos los procedimientos que han sido recomendados para la digestión y descontaminación, y varios los laboratorios que se guían por ellos. Se sabe que algunos procedimientos son compatibles con medios a base de huevo y no son adecuados para utilizarse con el método **BACTEC**. Se

recomienda usar los métodos del hidróxido de sodio (NaOH) y del N-acetil-L-cisteína-NaOH (NALC) con el sistema **BACTEC 460TB**. Es posible que existan otros métodos compatibles con el procedimiento **BACTEC**. No obstante, se carece de datos suficientes para demostrarlo de forma concluyente.

En las muestras obtenidas aseptícamente, no se requiere el proceso de descontaminación. Para más detalles consulte el Manual de productos y procedimientos del sistema **BACTEC 460TB**.

Inoculación del medio 12B: Antes de la inoculación quitar el tapón a presión del frasco **BACTEC** y buscar la presencia de rajaduras, contaminación, excesiva turbidez y membrana hinchada o hundida. **NO UTILIZAR** si se observa algún defecto.

Analizar todos los frascos de medio 12B con el instrumento **BACTEC 460TB** para eliminar los frascos con lecturas de fondo altas (IC 20) y para establecer una atmósfera rica en CO₂ dentro del frasco.

El medio 12B se puede utilizar como medio autónomo para la recuperación de micobacterias. Sin embargo, para lograr la máxima recuperación de micobacterias, además del frasco 12B podrá también inocularse un frasco de Lowenstein-Jensen (LJ), otras modificaciones del medio LJ ó 7H10/7H11 (placa regular o placa doble)¹³. La decisión de utilizar el medio 12B solo u con un medio convencional adicional debe hacerse después de examinar la experiencia y los requisitos propios de cada institución así como la información publicada^{4-7,14,15}.

La contaminación se puede reducir suplementando el medio con una muestra de antibióticos antes de su inoculación¹⁶. Existe un suplemento llamado **PANTA** con polimixina B, amfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim y azlocilina en forma liofilizada (para mayores detalles consulte el Manual de productos y procedimientos del sistema **BACTEC 460TB**). La inoculación de la muestra debe efectuarse dentro de las dos horas siguientes a la adición del suplemento **PANTA** al frasco de medio 12B. El fluido para reconstitución (RF) contiene POES (estearato de polioxietileno), una sustancia favorecedora del crecimiento¹⁷. Se recomienda que cuando no se use el suplemento **PANTA**, se añada únicamente 0,1 mL de RF al medio 12B antes de la inocular la muestra.

Por cada muestra usar una jeringa nueva estéril con punta fija o con punta **Luer-Lok**, inocular 0,5 mL de la muestra concentrada y bien mezclada en cada frasco de medio 12B. Un volumen mayor alterará el pH del medio debido al alto pH del inóculo. Sin embargo, las muestras obtenidas aseptícamente y no descontaminadas pueden ser inoculadas con un volumen de hasta 1,0 mL. Un volumen superior a 1,0 mL diluirá el medio, lo que podría afectar el crecimiento.

Usando un desinfectante apropiado, desinfectar la membrana de goma después de inocular un frasco o de retirar una alícuota de un frasco inoculado. Posteriormente limpiar la membrana con alcohol al 70%.

Los frascos inoculados deben incubarse a 37 ± 1 °C sin agitarlos, y analizarse con el instrumento **BACTEC 460TB** usando una mezcla de aire con un 5 a 10% de CO₂. Analizar los frascos inoculados cada dos o tres días durante las dos primeras semanas y después semanalmente, durante seis semanas. La frecuencia de estos análisis puede variar según el trabajo pendiente en el laboratorio.

Si se sospecha que una muestra contiene micobacterias cuya temperatura óptima de crecimiento difiere de 37 °C, (por ejemplo, *M. marinum* y *M. chelonae* requieren 30 °C), se deben inocular dos juegos de frascos: uno para incubarse a 37 °C y otro para incubarse a la temperatura óptima.

Preparar un frotis a partir del frasco con medio **BACTEC 12B**, con un IC entre 50 y 100. Si es positivo para bacterias ácido-resistentes, presentar los resultados del cultivo como positivos con identificación en proceso. Realizar un subcultivo en un medio sólido. Incubar el subcultivo a 37 ± 1 °C.

Diferenciación del complejo TB: Cuando un frasco con medio 12B alcance un IC de 50, efectuar la prueba de **BACTEC NAP** conforme al procedimiento recomendado. Este procedimiento diferenciará el complejo TB de otras micobacterias no tuberculosas (MOTT).

La determinación de especies de micobacterias debe efectuarse según las técnicas convencionales, conforme lo recomienda CDC³.

Subcultivos: Antes de tomar una muestra, realizar un subcultivo o preparar un frotis para tinción, debe ponerse el frasco en posición vertical y colocarse un trozo de algodón empapado en alcohol sobre la membrana. Para eliminar la presión en el frasco, introducir una aguja estéril con un filtro o tapón adecuado a través del trozo de algodón empapado en alcohol y la membrana. La aguja debe retirarse después de haber descendido la presión y antes de tomar una muestra del frasco para efectuar un subcultivo. La inserción y retirada de la aguja deben realizarse moviendo la mano en línea recta, evitando movimientos giratorios.

Prueba de sensibilidad farmacológica: Las pruebas de sensibilidad farmacológica de *M. tuberculosis* pueden efectuarse con un IC de 300 más un día adicional de incubación, o un GI IC de 500 (para mayores detalles consultar el Manual de productos y procedimientos del sistema **BACTEC 460TB**).

CONTROL DE CALIDAD

NO UTILIZAR los frascos después de la fecha de caducidad.

NO UTILIZAR los frascos que presenten indicios de roturas o defectos; desechar el frasco de forma apropiada.

Los certificados de control de calidad se incluyen con cada caja de medios. En los certificados de control de calidad aparecen los organismos de prueba, incluidos los cultivos ATCC especificados en los estándares del NCCLS, *Quality Assurance for Commercially Prepared Culture Media*¹⁸.

Como parte del programa diario de mantenimiento, los frascos para pruebas de rendimiento (equipo **BACTEC** para pruebas de rendimiento) deben analizarse en el instrumento **BACTEC 460 TB**. Si se obtienen lecturas bajas a pesar de haber analizado los frascos para la prueba de rendimiento según los procedimientos establecidos, esto podría ser señal de anomalías en el instrumento (consultar el prospecto PP-046JAA incluido en el paquete **BACTEC PTK**).

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda

consultar las instrucciones de NCCLS y las correspondientes normativas de CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

La lectura del instrumento se toma directamente en una escala de 0 a 999, conocida como índice de crecimiento. No es necesario hacer ningún tipo de cálculo. El índice de crecimiento es una medida del $^{14}\text{CO}_2$ radioactivo aspirado dentro de la cámara para iones y es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento activo dentro del frasco.

En los Estados Unidos las normas federales vigentes (CLIA '88) exigen que los resultados de prueba impresos por instrumentos se relacionen con la correspondiente muestra del paciente. Estos resultados impresos deben conservarse por lo menos durante dos años. Es posible que las normas locales o estatales sean más estrictas que los requisitos federales: consultar dichas normas para ver si existen otros requisitos que deben observarse.

Una vez que el IC alcance un valor de 10 o superior se supondrá que el cultivo presenta H positivo; el frasco debe analizarse diariamente. El frotis de bacterias ácido-resistentes es importante para la confirmación de la presencia de micobacterias. Una vez que se han observado bacterias ácido-resistentes en el frotis preparado a partir de un frasco positivo, los resultados para la muestra se presentarán como cultivo positivo para bacterias ácido-resistentes (identificación en proceso). El resultado de cultivos negativos debe presentarse después de seis semanas de incubación.

El tiempo de detección de un cultivo positivo varía considerablemente debido a factores como el tipo de muestra, el número de organismos presentes ella, el estado de tratamiento del paciente y la temperatura de incubación. Las diferencias en los procedimientos, y en particular en el método de descontaminación, pueden desempeñar un papel importante en el tiempo de detección. Se ha informado que el tiempo de detección promedio para *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas (frotis negativos o frotis positivos) es de 7 a 12 días. Los bacilos MOTT generalmente se detectan dos o tres días antes que *M. tuberculosis*.^{4,6,7,14,15}

La incidencia de contaminación varía de un laboratorio a otro, dependiendo del proceso de descontaminación usado. La contaminación en el frasco de aislamiento 12B es por lo general inferior a la que se observa normalmente en los medios convencionales, en los que una tasa de contaminación hasta del 5% es todavía aceptable. Mantener un registro de contaminación y calcular la tasa de contaminación periódicamente. Revisar el protocolo de procedimientos e introducir cambios si es necesario. Un frasco con medio 12B contaminado puede ser procesado de nuevo; consultar el procedimiento correspondiente en el Manual de productos y procedimientos del sistema **BACTEC 460TB**.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se deben extremar las precauciones para evitar contaminar la muestra durante la obtención e inoculación en el frasco **BACTEC**. Una muestra contaminada dará una lectura positiva, pero no indicará una muestra positiva clínicamente relevante. El usuario debe tomar tal determinación teniendo en cuenta factores como tipo de organismo aislado, presencia del mismo organismo en varios cultivos, historia clínica del paciente, revisión apropiada del equipo, etc. La contaminación también puede ser resultado del mantenimiento inadecuado de las agujas y los tubos **BACTEC**, de una desinfección inadecuada de la membrana o del funcionamiento defectuoso del sistema **BACTEC** para calentamiento de las agujas (consultar el Manual de uso y mantenimiento del sistema **BACTEC 460TB**).

El nivel del IC refleja la tasa y cantidad de crecimiento que está ocurriendo en el medio pero no puede ser cuantificada exactamente como lo sería a través del método de cuenta de colonias en medios sólidos. La morfología de las colonias y las características de pigmentación sólo pueden determinarse en medios sólidos.

Debido a la naturaleza de los materiales biológicos contenidos en los medios y a la variabilidad inherente de los organismos, el usuario debe tener en cuenta que podrían obtenerse resultados variables en la recuperación de ciertos organismos.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

En un estudio realizado por Tortoli et al. la recuperación de micobacterias se comparó en dos sistemas automáticos y uno manual. Las cepas aisladas con el sistema **BACTEC 460** empleando el medio 12B para micobacterias fueron 201, en contraste con 190 cepas aisladas con el sistema **BACTEC MGIT 960** y 167 cepas con el medio Lowenstein-Jensen. El tiempo promedio de detección empleando el medio **BACTEC 460** y 12B fue de 14,8 días¹⁹.

TABLA 1. Recuperación de micobacterias mediante sistemas individuales y combinados^a

Mycobacterium o muestra	Total (%) recuperado					
	Todo tipo de medios	Sistema BACTEC MGIT 960	Sistema BACTEC 460	Medio de Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC MGIT 960 + medio de Lowenstein-Jensen	Sistema BACTEC 460 + medio de Lowenstein-Jensen
Total	236	190 (80)	201 (85)	167 (71)	212 (90)	225 (95)
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	169	149 (88)	153 (92)	124 (74)	158 (94)	160 (95)
<i>M. xenopi</i>	24	13 (54)	11 (46)	17 (71)	21 (87)	22 (92)
Complejo <i>M. avium</i>	22	21 (95)	22 (100)	16 (73)	21 (95)	22 (100)
Otros MOTT ^b	21	7 (33)	15 (71)	10 (48)	12 (57)	21 (100)
Frotis positivo	228	122 (53)	121 (53)	103 (45)	125 (55)	127 (56)
Frotis negativo	108	68 (63)	80 (74)	64 (59)	87 (80)	98 (91)

^a Los taxa más frecuentes se consideraron por separado, y también las muestras con frotis negativos y frotis positivos.

^b micobacterias no tuberculosas (MOTT)

DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

442004	BACTEC 12B Medium, 4 mL, 100 por caja
444764	BATEC PANTA Plus Kit, suplemento antimicrobiano liofilizado (PANTA), 5 frascos; fluido de reconstitución, 10 mL, 5 frascos
442103	BACTEC NAP Differentiation Kit, 5 µg NAP por frasco, 10 frascos por caja
445203	BACTEC 460TB System Instrument
442102	BACTEC SIRE Drug Kit (100 pruebas)
442104	BACTEC Diluting Fluid (10 pruebas)
442146	Isoniazid, 1 frasco
442139	PZA Test Medium (5 pruebas)
442143	PZA Drug/Reconstituting Fluid (50 pruebas)

REFERENCIAS: Véase la sección "References" en el texto inglés.



Manufaktur / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производитель / Producător / Üretici / Proizvođač / Производител / Аткарушы



Use by / Spotřebuje do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutama enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naukdotike iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Исполняйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Uпотреbiti do / Исползовать до / дейін пайдалануға / Uпотрејebiti do /
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
 ЖОЖОЖ-АА-КК / ЖОЖОЖ-АА (АА = айдың соңы) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalognummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Kataložen nomer / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volititud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierter EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret repræsentant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизирани представител в EU / Reprezentant autorizat in Uniunea Europeană / Авгүра Топлулуğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik in EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostiska meditsiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinsches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicinska pomůcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostic Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Tplotní omezení / Temperaturbegrensning / Temperaturlimit / Temperaturriiimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hörmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje tploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegränsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (serie) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Kod partii (лот) / Топтама коды / Lot (kod)



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



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
800-638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland