

## Revisions

SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
2010/11	2011/06	5830-11

**Notes:**

1. BD Cat. Number 245122
2. Blank (Sheet) Size: Length: 10"      Width: 12 3/4"  
 Number of Pages: 24      Number of Sheets: 6  
 Page Size: Length 10"      Width 6 3/8"      Final Folded Size: 3" x 6 3/8"
3. Style (see illustrations below): # 5



4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes     No  
 No. of Colors: 1      PMS# Black
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	<b>BD</b> Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: L000180JAA		Category and Description Package Insert, BBL MGIT 7 mL Tube	Sheet: 1 of 25 <hr/> Scale: N/A	A

**Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL**With **BACTEC™ MGIT™ 960 Supplement Kit**

English:	pages	1 – 4	Italiano:	pagine	11 – 15
Français :	pages	4 – 8	Português:	páginas	15 – 18
Deutsch:	Seiten	8 – 11	Español:	páginas	18 – 21

L000180JAA  
2011/06

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 képviselőjétől. / 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. / Instrukcije ziskate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свяжитесь с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіндік жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

**INTENDED USE**

The **BBL™ MGIT™** Mycobacteria Growth Indicator Tube supplemented with **BACTEC™ MGIT™** Growth Supplement and **BBL™ MGIT™ PANTA™** antibiotic mixture is intended for the detection and recovery of mycobacteria using the **BACTEC™ MGIT™ 960** and **BACTEC™ MGIT™ 320** Systems. Acceptable specimen types are digested and decontaminated clinical specimens (except urine), and sterile body fluids (except blood).

**SUMMARY AND EXPLANATION**

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

The U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) have recommended that every effort must be made for laboratories to use the most rapid methods available for diagnostic mycobacteria testing. These recommendations include the use of both a liquid and a solid medium for mycobacterial culture.<sup>3,4</sup>

The **MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contains 7 mL of modified Middlebrook 7H9 Broth base.<sup>5,6</sup> The complete medium, with OADC enrichment and **PANTA** antibiotic mixture, is one of the most commonly used liquid media for the cultivation of mycobacteria.

All types of clinical specimens, pulmonary as well as extrapulmonary (except blood and urine) can be processed for primary isolation in the **MGIT** tube using conventional methods.<sup>4</sup> The processed specimen is inoculated into a **MGIT** tube, placed into the **BACTEC™ MGIT™** instrument for continuous monitoring until positive or the end of the testing protocol.

**PRINCIPLES OF THE PROCEDURE**

A fluorescent compound is embedded in silicone on the bottom of 16 x 100 mm round bottom tubes. The fluorescent compound is sensitive to the presence of oxygen dissolved in the broth. Initially, the large amount of dissolved oxygen quenches emissions from the compound and little fluorescence can be detected. Later, actively respiring microorganisms consume the oxygen and allow the fluorescence to be detected.

Tubes entered into the **BACTEC MGIT** instrument are continuously incubated at 37°C and monitored every 60 min for increasing fluorescence. Analysis of the fluorescence is used to determine if the tube is instrument positive; i.e., the test sample contains viable organisms. An instrument positive tube contains approximately 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> colony forming units per milliliter (CFU/mL). Culture vials which remain negative for a minimum of 42 days (up to 56 days) and which show no visible signs of positivity are removed from the instrument as negatives and sterilized prior to discarding.

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

Contamination is reduced when supplementing the **BBL MGIT** broth base with **BACTEC MGIT** Growth Supplement/**BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture prior to inoculation with a clinical specimen.

**REAGENTS**

The **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contains: 110 µL of fluorescent indicator and 7 mL of broth. The indicator contains Tris 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline ruthenium chloride pentahydrate in a silicone rubber base. The tubes are flushed with 10% CO<sub>2</sub> and capped with polypropylene caps.

Approximate Formula \* Per L of Purified Water:

Modified Middlebrook 7H9 Broth base	5.9 g
Casein peptone	1.25 g

**BACTEC MGIT** Growth Supplement contains 15 mL Middlebrook OADC enrichment.

Approximate Formula \* Per L of Purified Water:

Bovine albumin	50.0 g	Catalase	0.03 g
Dextrose	20.0 g	Oleic acid	0.1 g
Polyoxyethylene stearate (POES)	1.1 g		

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

Approximate Formula \* Per Vial Lyophilized **PANTA**:

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

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

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

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

**BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture** – On receipt, store lyophilized vials at 2 – 8°C. Once reconstituted, the **PANTA** mixture must be stored at 2 – 8°C and used within 5 days.

#### **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”<sup>7-10</sup> and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Working with *Mycobacterium tuberculosis* grown in culture requires Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.<sup>4</sup> Prior to use, each **MGIT** tube should be examined for evidence of contamination or damage. Discard any tubes if they appear unsuitable. Dropped tubes should be examined carefully. If damage is seen, the tube should be discarded.

In the event of tube breakage: 1) Close the instrument drawers; 2) Turn off the instrument; 3) Vacate the area immediately; 4) Consult your facility/CDC guidelines. An inoculated leaking or broken vial may produce an aerosol of mycobacteria; appropriate handling should be observed.

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

#### **SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

All specimens should be collected and transported as recommended by the CDC, the *Clinical Microbiology Procedures Handbook* or your laboratory procedure manual.<sup>11</sup>

#### **DIGESTION, DECONTAMINATION AND CONCENTRATION**

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

**SPUTUM:** Specimens should be processed using the NALC-NaOH method as recommended by the CDC’s *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup> Alternatively, use the **BBL™ MycoPrep™** kit for processing mycobacterial specimens (see “Availability”).

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

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

**TISSUE:** Tissue specimens should be processed as recommended by the CDC’s *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

The routine inoculation of solid media is especially important for optimal recovery of mycobacteria from tissue specimens as these specimen types are particularly susceptible to sporadic organism recovery.

**STOOL:** Suspend 1 g of feces in 5 mL of Middlebrook Broth. Agitate the suspension on a vortex mixer for 5 s. Proceed to the NALC-NaOH procedure as recommended by the CDC’s *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

**NOTE:** For all specimen processing methods, a phosphate buffer solution (pH 6.8) should be used to QS the sample decontaminant mixture to 50 mL prior to centrifugation. Resuspension of pellet must also be done using a fresh preparation of phosphate buffer solution (pH 6.8).

#### **PROCEDURE**

**Materials Provided:** **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tubes and **BACTEC MGIT 960** Supplement Kit, containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement and **BBL MGIT PANTA** Antibiotic Mixture (see “Availability”).

**Materials Required But Not Provided:** **Falcon™** brand 50 mL centrifuge tubes, 4% sodium hydroxide, 2.9% sodium citrate solution, N-acetyl-L-cysteine powder, phosphate buffer pH 6.8, vortex mixer, 37°C incubator, 1 mL sterile pipettes, sterile transfer pipettes, **BBL** Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, **BBL MycoPrep** Specimen Digestion / Decontamination Kit, **BBL** Middlebrook 7H9 Broth (see “Availability”) or other mycobacterial agars or egg-based media. Tissue homogenizer or sterile swab, **BBL** Normal Saline (see “Availability”), microscope and materials for staining slides, adjustable 1000 µL pipetter, corresponding sterile pipette tips, 5% sheep blood agar plates and tuberculocidal disinfectant.

#### **INOCULATION OF MGIT TUBES:**

**BBL MGIT** 7 mL Tubes must be used with a **BACTEC MGIT** instrument.

1. Reconstitute a lyophilized vial of **BBL MGIT PANTA** Antibiotic Mixture with 15 mL of **BACTEC MGIT** Growth Supplement.
2. Label the **MGIT** tube with the specimen number.
3. Unscrew the cap and aseptically add 0.8 mL of Growth Supplement/**MGIT PANTA** Antibiotic Mixture. For best results, the addition of Growth Supplement/**MGIT PANTA** Antibiotic Mixture should be made just prior to specimen inoculation.
4. Add 0.5 mL of the concentrated specimen suspension prepared above. Also add a drop (0.1 mL) of specimen to a 7H10 agar plate or other mycobacterial solid agar or egg-based medium.
5. Tightly recap the tube and mix well.
6. Tubes entered into the instrument will be automatically tested for the duration of the recommended 42 day testing protocol.

For specimens in which mycobacteria with different incubation requirements are suspected, a duplicate **MGIT** tube can be set up and incubated at the appropriate temperature; e.g., 30 or 42°C. Inoculate and incubate at the required temperature. These tubes must be manually read (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument *User’s Manual*).

For specimens suspected of containing *Mycobacterium haemophilum*, a source of hemin must be introduced into the tube at the time of inoculation and the tube incubated at 30°C. Aseptically place one strip of **BBL™ Taxo™ X** factor strip into each **MGIT** tube requiring the addition of hemin prior to inoculation of specimen (see “Availability”). These tubes must be manually read (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument *User’s Manual*).

7. Positive tubes, identified by the **BACTEC MGIT** instrument should be subcultured and an acid-fast smear prepared (see “Results”).

**All quality control testing, reprocessing, smear preparations, sub-culturing, etc., of presumptive positive tubes must be performed using bio-safety level (BSL) III practices and containment facilities.**

**Processing a Positive MGIT Tube:** NOTE – All steps should be performed in a biological safety cabinet.

1. Remove the **MGIT** tube from the instrument and transport to an area using BSL III practices and containment facilities.
2. Using a sterile transfer pipet, remove an aliquot from the bottom of the tube (approx. 0.1 mL) for stain preparations (AFB and Gram stains).
3. Inspect smear and preparations. Report preliminary results only after acid-fast smear evaluation.

At the end of six weeks incubation, perform a visual check of all instrument negative tubes. If the tube appears visually positive (i.e., non-homogenous turbidity, small grains or clumps) it should be subcultured, acid-fast stained and treated as a presumptive positive, provided the acid-fast smear result is positive. If the tube shows no signs of positivity, it should be sterilized prior to discarding.

**Reprocessing Contaminated MGIT tubes:** Contaminated MGIT tubes may be re-decontaminated and re-concentrated using the procedure in Appendix E - Supplemental Procedures of the **BACTEC MGIT Instrument User's Manual**.

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

Quality Control Certificates are provided on the BD website. Quality Control Certificates list test organisms, including ATCC™ cultures specified in the CLSI Approved Standard M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.<sup>12</sup>

NOTE: Middlebrook 7H9 Broth (supplemented) is exempt from User QC testing according to CLSI M22-A3.<sup>12</sup>

## RESULTS

An instrument-positive sample is determined by the **BACTEC MGIT** instrument and confirmed by an acid-fast smear.

## REPORTING OF RESULTS

An instrument positive tube must be confirmed by acid-fast smear. A positive AFB smear result indicates the presence of mycobacteria.

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

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

**If no microorganisms are present:** Reenter the tube into the instrument as an ongoing negative tube within 5 h of removal. Allow tube to complete test protocol. No reportable result.

Perform subculture from the **BBL MGIT** tube for identification and drug susceptibility testing.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

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

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

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

**MGIT** tubes which are instrument-positive may contain other non-mycobacterial species. Non-mycobacterial species may overgrow mycobacteria present. Such **MGIT** tubes should be re-decontaminated and re-cultured (refer to the **BACTEC MGIT Instrument User's Manual**). Reprocessing is strongly recommended if the original specimen source cannot be easily recollected; e.g. tissue specimen.

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

Due to the richness of the **MGIT** broth and to the non-selective nature of the **MGIT** indicator, it is important to follow the stated digestion/decontamination procedure to reduce the possibility of contamination. Adherence to procedural instructions, which includes use of recommended inoculum volume (0.5 mL), is critical for optimum recovery of mycobacteria.

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

Seeded culture studies were performed with twenty-four species (ATCC and wild strains) of mycobacteria using inoculum levels ranging from 10<sup>1</sup> to 10<sup>2</sup> CFU/mL. The following species were detected as positive in the **BACTEC MGIT 960 System**:

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> t	<i>M. phlei</i>	<i>M. trivale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

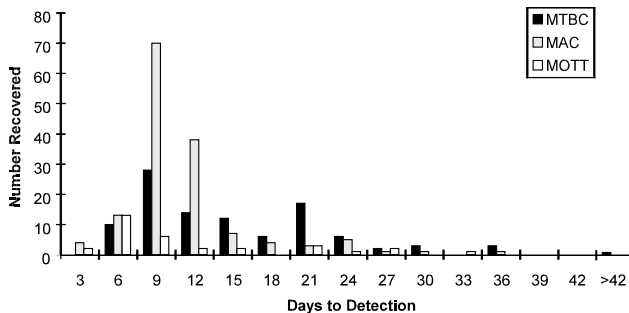
\*Species recovered during clinical evaluation of the **BACTEC MGIT 960 System**. In addition, *M. mucogenicum* was recovered at one of the clinical sites.

tThe *M. haemophilum* was recovered using the addition of a source of hemin to the **MGIT** tube prior to inoculation.

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

## EXPECTED VALUES

Figure 1 — Frequency distribution of recovery times for clinical trial specimens positive in the **BACTEC™ MGIT™ 960 System**



## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The **BACTEC MGIT 960 System** was evaluated at six clinical sites including one non-US site, which represented public health laboratories as well as large acute care hospitals in geographically diverse areas. The site population included patients infected with HIV, immunocompromised patients and transplant patients. The **BACTEC MGIT 960 System** was compared to the **BACTEC™ 460TB** radiometric system and conventional solid growth media for the detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens, except blood. A total of 3330 specimens were tested during the study. A total of 353 specimens were positive which represented 362 isolates recovered during the study. The distribution of positives by specimen type is: respiratory (90%), tissue (7%), body fluids (1%), stool (0.85%) and

bone marrow (0.65%). Of the 362 isolates, 289 (80%) were recovered by the **BACTEC MGIT 960** System, 271 (75%) were recovered by the **BACTEC 460TB** System and 250 (69%) were recovered by conventional solid media. Of the 3330 specimens tested in the clinical study, 27 (0.8%) **MGIT 960** tubes were determined to be false positive (instrument-positive, smear and/or subculture-negative). Of the 313 **MGIT 960** instrument positive tubes, 27 (8.6%) were determined to be false positive. The false negative rate (instrument-negative, smear and/or subculture-positive) was determined to be 0.5% based on terminal subcultures of 15% of instrument negative vials. The average breakthrough contamination rate for the **BACTEC MGIT 960** System was 8.1% with a range of 1.8 – 14.6%.

**Table 2: Detection of Mycobacteria Positive Isolates in Clinical Evaluations**

Isolates	Total isolates	Total MGIT 960	MGIT Only	Total BACTEC 460TB	BACTEC 460TB Only	Total CONV	CONV Only
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
<i>Mycobacteria</i> spp.	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. goodii</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
All MYCO	362	289	54	271	27	250	16

#### AVAILABILITY

Cat. No.	Description	Cat. No.	Description
245122	<b>BBL™ MGIT™</b> Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 7 mL, carton of 100 tubes.	240863	<b>BBL™ MycoPrep™</b> Specimen Digestion/Decontamination Kit, ten 150 mL bottles of NALC-NaOH solution and 10 packages of phosphate buffer.
245124	<b>BACTEC™ MGIT™</b> 960 Supplement Kit, 6 vials, 15 mL, <b>BACTEC™ MGIT™</b> Growth Supplement and 6 vials, lyophilized, <b>BBL™ MGIT™ PANTA™</b> Antibiotic Mixture. Each Growth Supplement/ <b>PANTA™</b> vial sufficient for 15 – 18 <b>MGIT™</b> tubes.	221174	<b>BBL™</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, package of 20.
220908	<b>BBL™</b> Lowenstein-Jensen Medium Slants, package of 10 (20 x 148 mm tubes with cap).	295939	<b>BBL™</b> Middlebrook 7H9 Broth, 8 mL, package of 10 tubes.
220909	<b>BBL™</b> Lowenstein-Jensen Medium Slants, carton of 100 (20 x 148 mm tubes with cap).	221818	<b>BBL™</b> Normal Saline, 5 mL, package of 10.
240862	<b>BBL™ MycoPrep™</b> Specimen Digestion/Decontamination Kit, ten 75 mL bottles of NALC-NaOH solution and 5 packages of phosphate buffer.	221819	<b>BBL™</b> Normal Saline, 5 mL, carton of 100.
		231106	<b>BBL™ Taxo™</b> X Factor Strips, 1 vial, 50 strips.

#### REFERENCES

- Bloom, B.R., and C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064.
- Horsburg, C.R., Jr., 1991. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 324:1332-1338.
- Tenover, F.C., et al, 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-770.
- Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS, Centers for Disease Control, Atlanta.
- Cohn, M.L., R.F. Waggoner and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 98:295-296.
- Youmans, G.P. 1979. Cultivation of mycobacteria, the morphology and metabolism of mycobacteria, p. 25-35. *Tuberculosis*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
- 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.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
- 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.
- Isenberg, Henry D. (ed.) 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*. vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Approved Standard M22-A3. Quality control for commercially prepared microbiological culture media, 3rd ed., CLSI, Wayne, Pa.

## **BD BBL MGIT** **Tube avec indicateur de croissance mycobactérienne 7 mL** **Avec le coffret du supplément BACTEC MGIT 960**

Français

#### APPLICATION

Le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** additionné du supplément de croissance **BACTEC MGIT** et du complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** est destiné à la détection et l'isolement de mycobactéries au moyen aux systèmes **BACTEC MGIT 960** et **BACTEC MGIT 320**. Les types d'échantillons acceptables sont des échantillons cliniques digérés et décontaminés (à l'exception de l'urine), et des liquides biologiques stériles (à l'exception du sang).

#### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

De 1985 à 1992, le nombre des cas confirmés d'infection avec *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a augmenté de 18 %. La tuberculose tue encore un nombre estimé à environ 3 millions de personnes par an à l'échelle mondiale, en faisant ainsi la principale maladie infectieuse pour cause de mortalité.<sup>1</sup> Entre 1981 et 1987, le suivi des cas de SIDA indiquait que 5,5 % des malades du SIDA avaient contracté des infections mycobactériennes non tuberculeuses ; par exemple MAC. Dès 1990 l'augmentation des cas de dissémination des infections mycobactériennes non tuberculeuses se traduisait par une incidence cumulée de 7,6 %.<sup>2</sup> En plus de la recrudescence de la tuberculose, les souches de TB résistantes aux antibiotiques (MDR-TB)

deviennent un souci croissant. Les délais pris par les laboratoires au niveau de la culture, l'identification et la publication de ces cas de résistance aux antibiotiques ont au moins en partie favorisé la dissémination de cette maladie.<sup>3</sup>

Les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommandent que les laboratoires fassent tous les efforts possibles pour appliquer les méthodes les plus rapides actuellement disponibles pour le diagnostic des mycobactéries. Ces recommandations font état de l'utilisation conjointe d'un milieu liquide et d'un milieu solide pour la culture des mycobactéries.<sup>3,4</sup>

Le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **MGIT** contient 7 mL d'un Bouillon de base Middlebrook 7H9 modifié.<sup>5,6</sup> Le milieu complet, additionné de supplément d'enrichissement OADC et de complexe d'antibiotiques **PANTA**, est un des milieux liquides les plus communément utilisés pour la culture des mycobactéries.

Les méthodes traditionnelles peuvent être appliquées à tous les types d'échantillons cliniques, pulmonaires ou non (à l'exception du sang et de l'urine) pour réaliser un isolement primaire dans le tube **MGIT**.<sup>4</sup> L'échantillon traité est inoculé dans un tube **MGIT** et placé dans l'instrument **BACTEC MGIT** pour un suivi continu jusqu'à l'obtention d'un résultat positif ou la fin du protocole d'analyse.

#### PRINCIPES DE LA METHODE

Un composé fluorescent est incorporé à de la silicone au fond de tubes de 16 x 100 mm à fond rond. Le composé fluorescent est sensible à la présence de l'oxygène dissous dans le bouillon. Initialement, la grande quantité d'oxygène dissous inhibe les émissions du composé et une faible fluorescence peut être détectée. Subséquemment, les microorganismes, en respirant, consomment l'oxygène du milieu et permettent la détection de la fluorescence.

Les tubes analysés avec l'instrument **BACTEC MGIT** sont incubés sans interruption à 37 °C et contrôlés toutes les 60 minutes à la recherche d'une augmentation de la fluorescence. L'analyse de la fluorescence sert à déterminer si le tube est positif selon l'appareil ; c'est-à-dire si l'échantillon contient des organismes vivants. Un tube positif selon l'appareil contient approximativement 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> d'unités formant colonies par millilitre (UFC/mL). Les flacons de culture qui restent négatifs pendant au moins 42 jours (jusqu'à 56 jours) et qui ne montrent aucun signe visible de positivité sont retirés de l'appareil en tant que négatifs et stérilisés avant d'être jetés.

Le supplément de croissance **BACTEC MGIT** est ajouté à chaque tube **MGIT** de façon à apporter les éléments essentiels à la croissance tube rapide des mycobactéries. L'acide oléique est utilisé par le bacille tuberculeux et joue un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. L'albumine agit comme agent protecteur en liant les acides gras libres qui peuvent être toxiques pour des espèces de *Mycobacterium*, augmentant ainsi leur récupération. Le dextrose est une source d'énergie. La catalase détruit les peroxydes toxiques qui peuvent être présents dans le milieu.

La contamination peut être réduite par l'addition au bouillon de base **BBL MGIT** du supplément de croissance **BACTEC MGIT**/complexe d'antibiotiques **MGIT PANTA** avant l'inoculation avec un échantillon clinique.

#### REACTIFS

Le tube avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** contient : 110 µL d'un indicateur fluorescent et 7 mL de bouillon. L'indicateur contient du chlorure de Tris 4, 7-diphényl-1, 10-phénanthroline ruthénium pentahydraté dans une base de caoutchouc à silicone. Les tubes sont gazés avec 10 % de CO<sub>2</sub> et fermés avec des capuchons en polypropylène.

Formule approximative \* par L d'eau purifiée :

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

Le supplément de croissance **BACTEC MGIT** contient 15 mL de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC.

Formule approximative \* par L d'eau purifiée :

Albumine bovine ..... 50,0 g	Catalase ..... 0,03 g
Dextrose ..... 20,0 g	Acide oléique ..... 0,1 g
Stéarate de polyoxyéthylène (POES) ..... 1,1 g	

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

Formule approximative \* par ampoule lyophilisée **PANTA** :

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

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

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

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

Complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** – Dès réception, conserver les ampoules lyophilisées entre 2 – 8 °C. Une fois reconstitué, le mélange **PANTA** doit être conservé entre 2 – 8 °C et utilisé dans les 5 jours.

#### AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

Pour 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"<sup>7-10</sup> et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Stériliser à l'autoclave les récipients contenant les échantillons et d'autres matériaux contaminés avant de les éliminer.

Travailler avec des cultures de *Mycobacterium tuberculosis* nécessite d'observer des procédures de protection contre les dangers biologiques de niveau 3 et l'usage d'équipement et de matériel de confinement.<sup>4</sup>

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

Les tubes qui sont tombés doivent être soigneusement examinés. S'ils sont endommagés d'une manière quelconque, ils doivent être jetés.

Dans le cas de bris du tube : 1) Eteindre l'appareil ; 2) Fermer les tiroirs de l'appareil ; 3) Evacuer la zone immédiatement ; 4) Se reporter aux directives de votre laboratoire/CDC. Un flacon inoculé fêlé ou qui fuit peut produire un aérosol de bactéries ; une manipulation appropriée doit donc être respectée.

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

#### PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Tous les échantillons doivent être recueillis et transportés selon les recommandations des CDC, du *Clinical Microbiology Procedures Handbook* ou les directives de votre laboratoire.<sup>11</sup>

#### DIGESTION, DECONTAMINATION ET CONCENTRATION

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

**CRACHATS** : les échantillons doivent être traités selon la méthode utilisant NALC-NaOH comme recommandé par les CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup> Alternativement, utiliser la trousse **BBL MycoPrep** pour analyser les échantillons mycobactériens (voir "Matériel disponible").

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

**LIQUIDES BIOLOGIQUES** : (LCR, liquide synovial, liquide pleural etc.) : les échantillons prélevés de manière aseptique et présumés exempts de bactéries autres que des mycobactéries peuvent être inoculés sans décontamination. Si le volume de l'échantillon est plus grand que 10 mL, concentrer par

centrifugation à 3.000 x g pendant 15 min. Jeter le surnageant. Inoculer le tube **MGIT** avec le sédiment. Les échantillons présumés contaminés par d'autres bactéries doivent être décontaminés.

**TISSUS** : les échantillons tissulaires doivent être analysés comme recommandé par les CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

Pour une mise en évidence optimale des mycobactéries, il est essentiel que les milieux solides soient inoculés systématiquement, parce que ces types d'échantillon livrent des résultats très aléatoires.

**SELLE** : suspendre 1 g de matières fécales dans 5 mL de Bouillon Middlebrook. Agiter la suspension avec un agitateur vortex pendant 5 sec. Suivre la méthode utilisant NALC-NaOH comme recommandé par les CDC dans *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

**NOTA** : pour toutes les méthodes de préparation des échantillons, une solution tampon au phosphate (pH 6,8) devrait être utilisée pour ramener le mélange de décontamination de l'échantillon à 50 mL avant centrifugation. La remise en suspension du sédiment doit aussi être effectuée à l'aide d'une solution fraîche de tampon au phosphate (pH 6,8).

## MODE OPERATOIRE

**Matériel fourni** : tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT** et coffret de supplément **BACTEC MGIT 960** contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT** et le complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** (voir "Matériel disponible").

**Matériaux requis mais non fournis** : tubes à centrifuger de 50 mL de marque **Falcon**, hydroxyde de sodium à 4 %, solution de citrate de sodium à 2,9 %, poudre de N-acétyl-L-cystéine, tampon phosphate pH 6,8, agitateur vortex, incubateur à 37 °C, pipettes stériles de 1 mL, pipettes de transfert stériles, Gélose **BBL Middlebrook** et Cohn 7H10, trousse de digestion/décontamination d'échantillon **BBL MycoPrep**, Bouillon **BBL Middlebrook 7H9** (voir "Matériel disponible"), ou autres géloses ou milieux à base d'oeufs pour mycobactéries. Homogénéisateur pour tissu ou écouvillons stériles, sérum physiologique normal **BBL** (voir "Matériel disponible"), microscope et matériel nécessaire pour colorer les lames, multipipette réglable de 1000 µL, embouts correspondants, boîtes de pétri de gélose à 5 % de sang de mouton et désinfectant tuberculocide.

## INOCULATION DES TUBES MGIT

Les tubes **BBL MGIT** 7 mL doivent être utilisés avec un appareil **BACTEC MGIT**.

1. Reconstituer une ampoule lyophilisée de complexe d'antibiotiques **BBL MGIT PANTA** avec 15 mL de supplément de croissance **BACTEC MGIT**.
2. Etiqueter le tube **MGIT** avec le numéro de l'échantillon.
3. Dévisser le capuchon et ajouter de manière aseptique 0,8 mL de supplément de croissance/complexe d'antibiotiques **MGIT PANTA**. Pour de meilleurs résultats, l'ajout du supplément de croissance/complexe d'antibiotiques **MGIT PANTA** devrait être fait juste avant l'inoculation de l'échantillon.
4. Ajouter 0,5 mL de la suspension concentrée d'échantillon préparée comme ci-dessus. Déposer aussi une goutte (0,1 mL) d'échantillon sur une gélose 7H10 ou tout autre milieu solide pour mycobactéries à base d'agar ou d'oeufs.
5. Refermer le tube hermétiquement et bien mélanger.
6. Les tubes placés dans l'appareil seront automatiquement analysés jusqu'à la fin du protocole d'analyse (42 jours).

Pour les échantillons suspectés de contenir des mycobactéries demandant des conditions d'incubation différentes, un double du tube **MGIT** peut être préparé et incubé à la température appropriée ; soit 30 ou 42 °C. Inoculer et incubé à la température demandée. Ces tubes doivent être lus manuellement (se reporter au *Manuel d'utilisation* de l'instrument **BACTEC MGIT**).

Pour les échantillons suspectés de contenir *Mycobacterium haemophilum*, une source d'hémine peut être incorporée au tube au moment où l'inoculation est faite, et le tube incubé à 30 °C. Introduire aseptiquement une bandelette **BBL Taxo** avec facteur X dans chaque tube **MGIT** demandant l'addition d'hémine avant d'inoculer l'échantillon (voir "Matériel disponible"). Ces tubes doivent être lus manuellement (se reporter au *Manuel d'utilisation* de l'instrument **BACTEC MGIT**).

7. Les tubes positifs, identifiés par l'appareil **BACTEC MGIT** doivent être repiqués et des frottis pour tester l'acido-résistance doivent être préparés (voir "Résultats").

**Toutes les analyses de contrôle de la qualité, les traitements, les préparations de frottis, les repiquages, etc., de tubes considérés positifs doivent être effectués selon les pratiques de biosécurité de niveau III (BSL) et dans des installations de confinement.**

**Traitement d'un tube MGIT positif** : **NOTA** – toute la procédure doit être effectuée dans une hotte de sécurité biologique.

1. Retirer le tube **MGIT** de l'appareil et le transporter dans une zone ayant des installations de confinement et appliquant les pratiques de biosécurité de niveau III.
2. A l'aide d'une pipette stérile, prélever une fraction aliquote dans le fond du tube (environ 0,1 mL) pour les colorations (acido-résistant et de Gram).
3. Inspecter le frottis et les préparations. Noter les résultats préliminaires seulement après avoir évalué la coloration acido-résistant.

A la fin des six semaines d'incubation, effectuez un contrôle visuel de tous les tubes jugés négatifs par l'instrument. Si le tube apparaît positif (c'est-à-dire, si une turbidité non-homogène, des petits grains ou des granules sont visibles), il doit être repiqué, soumis à une coloration acido-résistant et traité comme un positif présumé dans la mesure où la coloration acido-résistant est positive. Si le tube ne montre aucun signe de positivité, il doit être stérilisé avant d'être jeté.

**Traitement des tubes MGIT contaminés** : les tubes **MGIT** contaminés peuvent être décontaminés et re-concentrés au moyen de la procédure utilisée dans l'annexe E - Procédures supplémentaires du *Manuel d'utilisation* de l'instrument **BACTEC MGIT**.

**Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur** : 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 CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Des certificats de contrôle de qualité se trouvent dans le site web de BD. Les certificats de contrôle de qualité dressent la liste des microorganismes de test, y compris les cultures ATCC spécifiées dans la norme M22-A3 approuvée par le CLSI, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.<sup>12</sup>

**REMARQUE** : Le bouillon Middlebrook 7H9 (supplémenté) n'est pas soumis aux tests de Contrôle Qualité par l'utilisateur selon CLSI M22-A3.<sup>12</sup>

## RESULTATS

Un échantillon positif selon l'instrument est identifié par l'appareil **BACTEC MGIT** et ce résultat est confirmé par une coloration acido-résistant (AFB).

## RAPPORT DES RESULTATS

Un tube positif selon l'instrument doit être confirmé par frottis pour la coloration acido-résistant. Un frottis positif pour la coloration AFB indique la présence de mycobactéries.

**Si le frottis est positif pour la coloration AFB, repiquer sur milieux solides et noter** : positif selon l'appareil, frottis positif pour AFB, identification en cours.

**Si des microorganismes autres que des AFB sont présents, noter** : positif selon l'instrument, frottis négatif pour AFB. Contaminé.

**Si aucun microorganisme n'est présent** : dans un délai maximal de 5 h après l'avoir retiré, remettre le tube dans l'instrument en tant que négatif en cours. Soumettre le tube à la totalité du protocole d'analyse. Aucun résultat ne peut être noté.

Effectuez un repiquage du tube **BBL MGIT** pour l'identification et l'analyse de la sensibilité aux drogues.

## LIMITES DE LA METHODE

L'obtention de mycobactéries dans un tube **MGIT** dépend du nombre de microorganismes présents dans l'échantillon, des méthodes de prélèvement de l'échantillon, de facteurs propres au patient tels que la présence de symptômes, des traitements antérieurs et des méthodes d'analyse.

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

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

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

Les tubes **MGIT** jugés positifs selon l'instrument peuvent contenir des espèces autres que des mycobactéries. La croissance des espèces non-mycobactériennes peut excéder celle des mycobactéries présentes. De tels tubes **MGIT** doivent être décontaminés et repiqués (se reporter au *Manuel d'utilisation* de l'instrument **BACTEC MGIT**). Le traitement est fortement recommandé si la source d'échantillons initiale ne peut être facilement récupérée ; par exemple les échantillons de tissus.

Les tubes **MGIT** jugés positifs selon l'instrument peuvent contenir une ou plusieurs espèces de mycobactéries. Les mycobactéries à croissance plus rapide peuvent être décelées avant les mycobactéries à croissance plus lente ; c'est pourquoi il est important de repiquer les tubes **MGIT** positifs afin d'assurer une identification correcte de toutes les mycobactéries présentes dans l'échantillon.

Du fait de la richesse du Bouillon **MGIT** et de la nature non sélective de l'indicateur **MGIT**, il est important de suivre la procédure décrite de digestion/décontamination pour réduire le risque de contamination. Une stricte observation des instructions de procédure, y compris l'utilisation du volume recommandé d'inoculum (0,5 mL) est essentielle pour une récupération optimale des mycobactéries.

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

Des études de cultures ensemencées ont été réalisées sur vingt-quatre espèces de mycobactéries (ATCC et sauvages) avec des inoculums comptant  $10^1 - 10^2$  UFC/mL. Les espèces suivantes ont été considérées comme positives dans le système **BACTEC MGIT 960** :

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> <sup>†</sup>	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

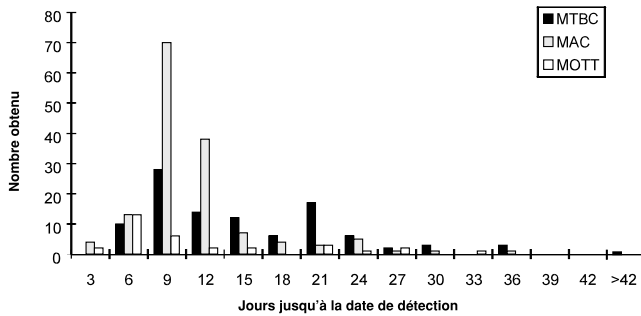
\*Espèces obtenues lors de l'évaluation clinique du système **BACTEC MGIT 960**. De plus, *M. mucogenicum* a été collecté à un des sites cliniques.

<sup>†</sup>Le *M. haemophilum* a été collecté grâce à l'ajout d'une source d'hémine au tube **MGIT** avant inoculation.

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

## VALEURS ESCOMPTEES

Figure 1 — Histogramme de la fréquence des délais de récupération pour les échantillons des essais cliniques positifs dans le système **BACTEC MGIT 960**



## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Le système **BACTEC MGIT 960** a été évalué dans six sites cliniques, dont un ne se trouvant pas aux Etats-Unis, comprenant aussi bien des laboratoires publics que de grands hôpitaux de soins intensifs situés dans diverses régions géographiques. La population de chaque site comprenait des patients infectés par VIH, des patients avec des déficiences immunologiques et des patients ayant reçu une greffe. Le système **BACTEC MGIT 960** a été comparé au système de radiométrie **BACTEC 460TB** et aux milieux solides traditionnels pour la détection et l'obtention de mycobactéries dans des échantillons cliniques (à l'exception du sang). Un total de 3330 échantillons ont été analysés lors de cette étude. Un total de 353 échantillons étaient positifs, ce qui correspondait aux 362 isolats obtenus lors de cette étude. Le classement des échantillons analysés en fonction de leur source d'origine était : respiratoire (90 %), tissulaire (7,0 %), liquide biologique (1,0 %), selle (0,85 %) et moelle osseuse (0,65 %). De ces 362 isolats, 289 (80 %) ont été récupérés par le système **BACTEC MGIT 960**, 271 (75 %) ont été récupérés par le **BACTEC 460TB** et 250 (69 %) ont été obtenus avec les milieux solides traditionnels. Des 3330 échantillons analysés dans cette étude, 27 (0,8 %) tubes **MGIT 960** ont donné un taux de faux positifs (positif selon l'instrument, négatif selon le frottis et/ou le repiquage). Des 313 tubes **MGIT 960** positifs selon l'instrument, 27 (8,6 %) ont donné un taux de faux positifs. Le taux de faux négatifs (négatif selon l'instrument, positif selon le frottis et/ou le repiquage) a été évalué à 0,5 % basé sur les repiquages finaux de ~ 15 % de flacons négatifs selon l'instrument. Le taux de contamination moyen pour le système **BACTEC MGIT 960** était de 8,1 % allant de 1,8 % à 14,6 %.

TABLEAU 2: Détection des isolats positifs de mycobactéries dans les évaluations cliniques

Isolat	Total des isolates	Total MGIT 960	MGIT seulement	Total BACTEC 460TB	BACTEC 460TB seulement	Total CONV	CONV seulement
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
<i>Mycobacteria spp.</i>	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. gordonae</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
MYCO tous	362	289	54	271	27	250	16

## MATERIEL DISPONIBLE

No réf.	Description	No réf.	Description
245122	Tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne <b>BBL MGIT</b> , 7 mL, carton de 100 tubes.	240862	Trousse <b>BBL MycoPrep</b> de digestion et de décontamination d'échantillons, comprenant dix flacons de 75 mL de solution de NALC-NaOH et 5 sachets de tampon phosphate.
245124	Coffret de supplément <b>BACTEC MGIT 960</b> , 6 flacons, 15 mL, supplément de croissance <b>BACTEC MGIT</b> et 6 flacons de complexe d'antibiotiques <b>BBL MGIT PANTA</b> , lyophilisé. Chaque ampoule de supplément de croissance/ <b>PANTA</b> est suffisante pour 15 – 18 tubes <b>MGIT</b> .	240863	Trousse <b>BBL MycoPrep</b> de digestion et de décontamination d'échantillons, comprenant dix flacons de 150 mL de solution de NALC-NaOH et 10 sachets de tampon phosphate.
220908	Géloses inclinées <b>BBL Lowenstein-Jensen</b> , coffret de 10 (tubes de 20 x 148 mm avec capuchon).	221174	Gélose <b>BBL Middlebrook</b> et Cohn 7H10, coffret de 20.
220909	Géloses inclinées <b>BBL Lowenstein-Jensen</b> , coffret de 100 (tubes de 20 x 148 mm avec capuchon).	295939	Bouillon <b>BBL Middlebrook 7H9</b> , 8 mL, coffret de 10 tubes.
		221818	Sérum physiologique normal <b>BBL</b> , 5 mL, coffret de 10.
		221819	Sérum physiologique normal <b>BBL</b> , 5 mL, coffret de 100.
		231106	Bandelettes <b>BBL Taxo</b> avec facteur X, un flacon, 50 bandelettes.

**BIBLIOGRAPHIE** : voir la rubrique "Références" du texte anglais.



# BBL MGIT

## Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum 7 mL Mit BACTEC MGIT 960-Supplement-Kit

Deutsch

### VERWENDUNGSZWECK

Das **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, das mit dem **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement und dem **BBL MGIT PANTA**-Antibiotischen Gemisch angereichert werden kann, dient zum Nachweis und zur Isolierung von Mykobakterien unter Verwendung des **BACTEC MGIT 960**- und **BACTEC MGIT 320**-Geräts. Geeignete Proben sind digesterte und dekontaminierte klinische Proben (außer Urin) und sterile Körperflüssigkeiten (außer Blut).

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

Die U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) empfehlen, daß Labors alle Anstrengungen unternehmen, um die schnellsten verfügbaren Methoden zum diagnostischen Testen auf Mykobakterien einzusetzen. Diese Empfehlungen umfassen die Verwendung sowohl eines flüssigen als auch eines festen Mediums zur Kultivierung von Mykobakterien.<sup>3,4</sup>

Das **MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält 7 mL modifizierte Middlebrook 7H9-Bouillonbasis.<sup>5,6</sup> Das komplette, mit OADC-Anreicherung und **PANTA**-Antibiotischem Gemisch angereicherte Medium ist eines der am häufigsten verwendeten flüssigen Medien zur Kultivierung von Mykobakterien.

Alle klinischen Probenotypen, pulmonale sowie extra-pulmonale Proben (außer Blut und Urin) können mit Hilfe konventioneller Methoden für die Primärisolierung im **MGIT**-Röhrchen vorbereitet werden.<sup>4</sup> Die vorbereitete Probe wird in ein **MGIT**-Röhrchen inokuliert, dann in ein **BACTEC MGIT**-Gerät zur kontinuierlichen Beobachtung gesetzt bis es positiv oder das Ende des Testprotokolls erreicht ist.

### VERFAHRENSPRINZIP

Eingebettet in Silikon am Boden von 16 x 100-mm-Röhrchen mit rundem Boden befindet sich eine fluoreszierende Verbindung. Die fluoreszierende Verbindung spricht auf das Vorliegen von in der Bouillon aufgelöstem Sauerstoff an. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da die große Menge aufgelösten Sauerstoffs die Emissionen der Verbindung absorbiert. Später nehmen die aktiv respirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf, und die Fluoreszenz kann nachgewiesen werden.

Die in das **BACTEC MGIT**-Gerät gegebenen Röhrchen werden fortwährend bei 37 °C inkubiert und alle 60 Minuten auf ansteigende Fluoreszenz überprüft. Durch Analyse der Fluoreszenz ist feststellbar, ob das Fläschchen gerätepositiv ist, d.h. ob die Probe lebensfähige Organismen enthält. Ein geräte-positives Röhrchen enthält etwa 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> koloniebildende Einheiten pro Milliliter (KBE/mL). Kulturfläschchen, die nach mindestens 42 Tagen (bis zu 56 Tagen) negativ bleiben und die keine sichtbare Zeichen von Positivität aufweisen, sind als negativ zu behandeln und werden von dem Gerät entfernt und vor dem Entsorgen sterilisiert.

Das **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement wird jedem **MGIT**-Röhrchen hinzugefügt, um Substanzen, die wesentlich zum schnellen Wachstum von Mykobakterien beitragen, zur Verfügung zu stellen. Ölsäure wird von Tuberkelbakterien verwertet und spielt beim Stoffwechsel von Mykobakterien eine wichtige Rolle. Albumin agiert als Schutzmittel und verbessert die Isolierung von *Mycobacterium*-Spezies, indem es freie Fettsäuren bindet, die für diese toxisch sein können. Dextrose ist eine Energiequelle. Katalase zerstört eventuell im Medium vorkommende toxische Peroxide.

Durch Supplementierung der **BBL MGIT**-Bouillonbasis mit **BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement/**MGIT PANTA**-Antibiotischem Gemisch vor der Inokulation mit den klinischen Proben wird die Kontamination reduziert.

### REAGENZIEN

Das **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält: 110 µL Fluoreszenzindikator und 7 mL Bouillon. Der Indikator enthält Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid-Pentahydrat in Silikonkautschuk-Basis. Die Röhrchen sind mit 10%igem CO<sub>2</sub> ausgespült und mit Polypropylenkappen verschlossen.

Ungefähre Zusammensetzung \* pro L destilliertem Wasser:

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

**BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement enthält 15 mL Middlebrook OADC-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung \* pro L destilliertem Wasser:

Rinderalbumin ..... 50,0 g  
Dextrose ..... 20,0 g  
Polyoxyethylen-Stearat (POES) ..... 1,1 g  
Katalase ..... 0,03 g  
Ölsäure ..... 0,1 g

Das **BBL MGIT PANTA**-Fläschchen enthält eine lyophilisierte Mischung von antimikrobiellen Agenzien.

Ungefähre Zusammensetzung \* pro Fläschchen lyophilisiertem **PANTA**:

Polymixin B ..... 6.000 Einheiten  
Amphotericin B ..... 600 µg  
Nalidixinsäure ..... 2.400 µg  
Trimethoprim ..... 600 µg  
Azlocillin ..... 600 µg

\*Abgestimmt und/oder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

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

**BACTEC MGIT**-Wachstumssupplement – Nach Erhalt im Dunkeln bei 2 – 8 °C lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor hellem Licht schützen.

**BBL MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch – Lyophilisierte Fläschchen nach Erhalt bei 2 – 8 °C lagern. Nach Rekonstituierung muß das **PANTA**-Gemisch bei 2 – 8 °C gelagert und innerhalb von 5 Tagen verwendet werden.

## WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Zur *in vitro*-Diagnostik.

Dieses Produkt enthält trockenen Naturkautschuk.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die "Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"<sup>7-10</sup> sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Nach Gebrauch Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Verfahren, die in Kultur gezüchtetes *Mycobacterium tuberculosis* beinhalten, müssen nach den Richtlinien und unter Anwendung der Sicherheitsvorrichtungen der Biologischen Sicherheitsstufe 3 durchgeführt werden.<sup>4</sup>

Vor Gebrauch muß jedes **MGIT**-Röhrchen auf Anzeichen von Kontamination oder Beschädigung untersucht werden. Fläschchen, die unbrauchbar erscheinen, sind zu entsorgen.

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

Bei Beschädigung des Fläschchens: 1) Gerätefächer zumachen 2) Gerät abschalten 3) Bereich sofort verlassen 4) CDC oder laborinterne Richtlinien zu Rate ziehen. Ein inokuliertes undichtes oder zerbrochenes Fläschchen kann ein Mykobakterien-Aerosol erzeugen; deshalb sollten angemessene Maßnahmen verwendet werden.

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

## PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Alle Proben sollten gemäß den Empfehlungen der CDC, dem *Clinical Microbiology Procedures Handbook* oder den Verfahrensvorschriften des jeweiligen Labors entnommen und transportiert werden.<sup>11</sup>

## DIGESTION, DEKONTAMINATION UND KONZENTRATION

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

**SPUTUM**: Proben sollten unter Anwendung des NALC-NaOH-Verfahrens gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*<sup>4</sup> gegebenen Empfehlungen der CDC verarbeitet werden. Als Alternative kann der **BBL MycoPrep**-Kit zur Verarbeitung von Mykobakterienproben verwendet werden (s. "Lieferbare Produkte").

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

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

**GEWEBE**: Gewebeproben sollten gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*<sup>4</sup> gegebenen Empfehlungen der CDC verarbeitet werden.

Regelmäßige Inokulation von festen Medien ist zur optimalen Gewinnung von Mykobakterien aus Gewebeproben besonders wichtig, da Organismen aus diesen Proben typen besonders schwer zu isolieren sind.

**STUHL**: 1 g Fäzes in 5 mL Middlebrook-Bouillon suspendieren. Suspension 5 Sek. im Vortex-Mixer mischen. Die weitere Verarbeitung sollte unter Anwendung des NALC-NaOH-Verfahrens gemäß den in *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*<sup>4</sup> gegebenen Empfehlungen der CDC erfolgen.

**HINWEIS**: Bei allen Probenverarbeitungsmethoden muß eine Phosphatpufferlösung (pH 6,8) verwendet werden, um damit vor der Zentrifugation eine Qualitätskontrolle von bis zu 50 mL des Probendekontaminierungsgemisches durchzuführen. Eine Resuspendierung des Pellets muß ebenfalls unter Verwendung einer frischen Zubereitung von Phosphatpufferlösung (pH 6,8) durchgeführt werden.

## VERFAHREN

**Mittelgeliefertes Arbeitsmaterial**: **BBL MGIT**-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum und **BACTEC MGIT 960**-Supplementskit mit **BACTEC MGIT** Wachstumssupplement und **BBL MGIT PANTA**-Antibiotischem Gemisch (s. "Lieferbare Produkte").

**Benötigtes, jedoch nicht mittelgeliefertes Arbeitsmaterial**: Falcon 50-mL-Zentrifugenröhrchen, 4%iges Natriumhydroxid, 2,9%ige Natriumcitratlösung, N-Acetyl-L-Cystein-Pulver, Phosphatpuffer mit pH 6,8, Vortex-Mixer, Inkubator (37 °C), sterile 1-mL-Pipetten, sterile Transferpipetten, **BBL Middlebrook** und Cohn 7H10 Agar, **BBL MycoPrep** Aufschluß-/Dekontaminationskit für Proben, **BBL Middlebrook 7H9-Bouillon** (s. "Lieferbare Produkte") oder andere Agar- oder Eiermedien für Mykobakterien. Gewebehomogenisator oder steriler Tupfer, **BBL Normale Kochsalzlösung** (s. "Lieferbare Produkte"), Mikroskop und Materialien zum Färben der Objektträger, verstellbare 1000-µL-Pipette, dazu passende sterile Pipettenspitzen, 5%ige Schafblut-Agarplatten und Tuberkelbazillen-Desinfektionsmittel.

## INOKULIERUNG DER MGIT-RÖHRCHEN

**BBL MGIT** 7mL-Röhrchen müssen mit einem **BACTEC MGIT**-Gerät verwendet werden.

1. Ein lyophilisiertes Fläschchen mit **BBL MGIT PANTA**-Antibiotischem Gemisch mit 15 mL **BACTEC MGIT** Wachstumssupplement rekonstituieren.
2. Das **MGIT**-Röhrchen mit der Probennummer beschriften.
3. Die Kappe entfernen und aseptisch 0,8 mL Wachstumssupplement/**MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch hinzufügen. Um beste Ergebnisse zu erzielen, sollten Wachstumssupplement/**MGIT PANTA**-Antibiotisches Gemisch erst unmittelbar vor der Inokulierung hinzugefügt werden.
4. 0,5 mL der vorbereiteten konzentrierten Probensuspension hinzufügen. Außerdem einen Tropfen (0,1 mL) der Probe auf eine 7H10-Agarplatte oder einen anderen festen Agar- oder Eiernährboden für Mykobakterien geben.
5. Das Röhrchen wieder fest verschließen und gut durchmischen.
6. Im Gerät befindliche Röhrchen werden für die Gesamtdauer der Testprotokollaufnahme (42 Tage) automatisch getestet.

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

Bei Proben mit Verdacht auf *Mycobacterium haemophilum* muß bei der Inokulation eine Hämingerulle in das Röhrchen zugeführt werden und das Röhrchen bei 30 °C inkubiert werden. Einen **BBL Taxo X**-Faktorstreifen aseptisch in jedes **MGIT**-Röhrchen legen, in das Häm in vor der Probeninokulation zugefügt werden muß (s. "Lieferbare Produkte"). Diese Röhrchen müssen manuell abgelesen werden (s. **BACTEC MGIT**-Gerät *Benutzerhandbuch*).

7. Von positiven Röhrchen, die vom **BACTEC MGIT**-Gerät identifiziert wurden, sollte eine Subkultur angelegt und ein Ausstrich für eine Säurefestigkeitsfärbung angefertigt werden (s. "Ergebnisse").

**Alle Testverfahren zur Qualitätskontrolle, erneute Verarbeitung, Ausstrich-Anfertigung und Anlegen einer Subkultur von präsumtiv positiven Röhrchen** müssen gemäß Biosicherheitsstufe III und unter Verwendung von Eindämmungseinrichtungen gehandhabt werden.

**Verarbeitung eines positiven MGIT-Röhrchens**: **HINWEIS** – Alle Schritte sollten in einer biologischen Sicherheitswerkbank ausgeführt werden.

1. **MGIT**-Röhrchen aus dem Gerät nehmen und Transport gemäß Biosicherheitsstufe III und unter Verwendung von Eindämmungseinrichtungen durchführen.
2. Mit Hilfe einer sterilen Transferpipette ein Aliquot (etwa 0,1 mL) vom Boden des Röhrchens zur Anfertigung von Färbungen entnehmen (Säurefestigkeitsfärbung und Gram-Färbung).

### 3. Ausstrich und Färbung prüfen. Vorläufige Ergebnisse erst nach Beurteilung des Säurefestigkeitsausstriches dokumentieren.

Am Ende einer sechswöchigen Inkubation eine visuelle Überprüfung aller gerätenegativen Röhrchen durchführen. Erscheint das Röhrchen visuell positiv (d.h. inhomogene Trübung, kleine Körner oder Klümpchen), sollte eine Subkultur angelegt und eine Säurefestigkeitsfärbung angefertigt werden und das Röhrchen als positiv behandelt werden, vorausgesetzt das Ergebnis des Säurefestigkeitsausstriches ist positiv. Weist das Röhrchen keine sichtbaren Zeichen von Positivität auf, sollte es vor dem Entsorgen sterilisiert werden.

**Erneute Verarbeitung kontaminierter MGIT-Röhrchen:** Kontaminierte MGIT-Röhrchen können durch Verwendung der in Anhang E - Zusätzliche Verfahren des *Benutzerhandbuches* für das BACTEC MGIT-Gerät wieder dekontaminiert und konzentriert werden.

**Qualitätskontrolle durch den Anwender:** Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die vom CLSI relevanten Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

Qualitätskontrollzertifikate sind auf der BD-Website verfügbar. In den Qualitätskontrollzertifikaten sind Testorganismen, einschließlich der im CLSI zugelassenen Standard M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*, spezifizierten ATCC-Kulturen, aufgeführt.<sup>12</sup>

HINWEIS: Middlebrook 7H9-Bouillon (ergänzt) ist gemäß CLSI M22-A3 von Qualitätskontrolltests durch den Anwender ausgenommen.<sup>12</sup>

#### ERGEBNISSE

Eine gerätepositive Probe wird durch das BACTEC MGIT-Gerät bestimmt und durch einen Ausstrich für eine Säurefestigkeitsfärbung bestätigt.

#### BERICHTEN VON ERGEBNISSEN

Ein gerätepositives Röhrchen muß durch eine Säurefestigkeitsfärbung bestätigt werden. Eine positive Säurefestigkeitsfärbung indiziert das Vorhandensein von Mikroorganismen im Röhrchen.

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

**Wenn andere Mikroorganismen als säurefeste Bakterien vorhanden sind, wie folgt dokumentieren:** Gerätepositiv, Säurefestigkeitsfärbung negativ. Kontaminiert.

**Wenn keine Mikroorganismen vorhanden sind:** Das Röhrchen innerhalb von 5 h nach dem Herausnehmen als ständige negative Kontrolle wieder in das Gerät stellen. Röhrchen bis zur Vollendung des Testprotokolls mitführen. Kein Ergebnis zu dokumentieren.

Subkultur vom BBL MGIT-Röhrchen zur Identifikation und zur Arzneimittelempfindlichkeitsprüfung anlegen.

#### VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

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

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

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

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

MGIT-Röhrchen, die gerätepositiv sind, können neben Mykobakterien Begleitkeime enthalten. Begleitkeime können vorhandene Mykobakterien überwachen. Solche MGIT-Röhrchen sollten erneut dekontaminiert und kultiviert werden (s. BACTEC MGIT-Gerät *Benutzerhandbuch*). Erneute Verarbeitung wird nachdrücklich empfohlen, wenn die Originalprobe nur schwer zu erhalten ist, z.B. Gewebeprobe.

MGIT-Röhrchen, die gerätepositiv sind, können mehrere Spezies von Mykobakterien enthalten. Schneller wachsende Mykobakterien können vor langsamer wachsenden Mykobakterien nachgewiesen werden; daher ist es wichtig, eine Subkultur positiver MGIT-Röhrchen anzulegen, um alle in der Probe vorhandenen Mykobakterien korrekt zu identifizieren.

Da die MGIT-Bouillon sehr wachstumsfördernd und der MGIT-Indikator nicht selektiv ist, müssen die angegebenen Verfahren zur Digestion/Dekontamination unbedingt eingehalten werden, um die Möglichkeit einer Kontamination zu verringern. Die Beachtung der Verfahrensanleitungen, die die Verwendung des empfohlenen Inokulumvolumens (0,5 mL) einschließt, ist für eine optimale Isolierung von Mykobakterien äußerst wichtig.

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

Studien mit beimpften Kulturen wurden unter Verwendung von vierundzwanzig Mykobakterienspezies (mit ATCC-Stämmen und Wildstämmen) durchgeführt. Dabei wurden Inokulumkonzentrationen von 10<sup>1</sup> bis 10<sup>2</sup> KBE/mL verwendet. Die folgenden Spezies wurden im BACTEC MGIT 960-System als positiv nachgewiesen:

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> <sup>†</sup>	<i>M. phlei</i>	<i>M. trivale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

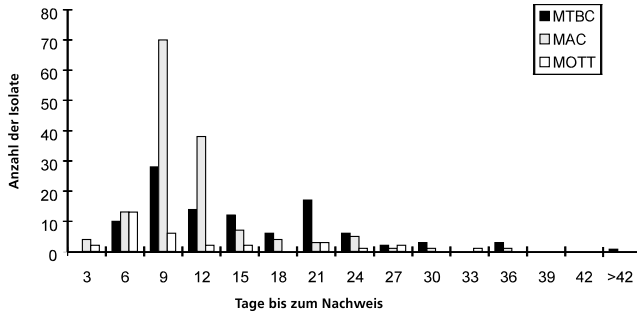
\*Bei der klinischen Beurteilung des BACTEC MGIT 960-Systems isolierte Spezies. Darüber hinaus wurde *M. mucogenicum* an einem der klinischen Labors nachgewiesen.

<sup>†</sup>*M. haemophilum* wurde isoliert, indem eine zusätzliche Häminquelle dem MGIT-Röhrchen vor der Inokulation zugegeben wurde.

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

ERWARTETE WERTE

Abbildung 1 – Häufigkeitsverteilung der Isolierungszeit für im BACTEC MGIT 960-System positive Studienproben



LEISTUNGSMERKMALE

Das BACTEC MGIT 960-System wurde an sechs klinischen Zentren (darunter ein außeramerikanisches Zentrum), die öffentliche Gesundheitslabors und große Notfallkrankenhäuser an geographisch unterschiedlichen Standorten darstellten, beurteilt. Die Patientenpopulation der Zentren umfaßte HIV-infizierte und immungeschwächte Patienten und Transplantatempfänger. Das BACTEC MGIT 960-System wurde mit dem radiometrischen BACTEC 460TB-System und konventionellen festen Wachstumsmedien zum Nachweis und zur Isolierung von Mykobakterien aus klinischen Proben (außer Blut) verglichen. Im Verlauf der Studie wurden insgesamt 3330 Proben getestet. Insgesamt waren 353 Proben positiv, die 362 während der Studie gewonnene Isolate repräsentierten. Die Anteile der positiven Proben nach Entnahmestelle waren: Atemwege (90 %), Gewebe (7 %), Körperflüssigkeiten (1 %), Stuhl (0,85 %) und Knochenmark (0,65 %). Von diesen 362 Isolaten wurden 289 (80 %) mit Hilfe des BACTEC MGIT 960-Systems, 271 (75 %) mit dem BACTEC 460TB-System und 250 (69 %) mit konventionellen festen Medien isoliert. Von den 3330 in der klinischen Studie getesteten Proben, 27 (0,8 %) MGIT 960-Röhrchen wiesen falschpositive Ergebnisse auf (gerätepositiv, Ausstrich und/oder Subkultur negativ). Von den 313 MGIT 960 gerätepositiven Röhrchen wiesen 27 (8,6 %) falschpositive Ergebnisse auf. Anhand von Subkulturen von etwa 15 % gerätenegativen Fläschchen konnte das Ergebnis der falschpositiven Rate (gerätenegativ, Ausstrich und/oder Subkultur positiv) auf 0,5 % festgelegt werden. Die durchschnittliche Durchbruch-Kontaminationsrate bei dem BACTEC MGIT 960-System betrug 8,1 %, wobei der Bereich von 1,8 % – 14,6 % schwankte.

Tabelle 2: Nachweis von Mykobakterien-positiven Isolaten bei klinischen Beurteilungene

Isolate	Total gesamt	MGIT 960 gesamt	Nur MGIT	BACTEC 460TB gesamt	Nur BACTEC 460TB	CONV gesamt	Nur CONV
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
<i>Mycobacteria spp.</i>	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. gordonae</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
MYCO gesamt	362	289	54	271	27	250	16

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung	Best.- Nr.	Beschreibung
245122	BBL MGIT-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, 7 mL, Karton mit 100 Röhrchen.	240862	BBL MycoPrep Aufschluß-/Dekontaminationskit für Proben, zehn 75-mL-Fläschchen mit NALC-NaOH-Lösung und 5 Packungen mit Phosphatpuffer.
245124	BACTEC MGIT 960-Supplement-kit, mit 6 15-mL-Fläschchen BACTEC MGIT Wachstumssupplement und 6 Fläschchen lyophilisiertem BBL MGIT PANTA-Antibiotischem Gemisch. Jedes Wachstums-supplement/PANTA-Fläschchen reicht für 15 – 18 MGIT-Röhrchen aus.	240863	BBL MycoPrep Aufschluß-/Dekontaminationskit für Proben, zehn 150-mL-Fläschchen mit NALC-NaOH-Lösung und 10 Packungen mit Phosphatpuffer.
220908	BBL Löwenstein-Jensen-Schrägagar, Packung mit 10 Stück (20 x 148-mm-Röhrchen mit Kappe).	221174	BBL Middlebrook und Cohn 7H10 Agar, Packung mit 20.
220909	BBL Löwenstein-Jensen-Schrägagar, Karton mit 100 Stück (20 x 148-mm-Röhrchen mit Kappe).	295939	BBL Middlebrook 7H9-Bouillon, 8 mL, Packung mit 10 Röhrchen.
		221818	Normale Kochsalzlösung, 5 mL, Packung mit 10.
		221819	BBL Normale Kochsalzlösung, 5 mL, Karton mit 100.
		231106	BBL Taxo X-Faktorstreifen, 1 Fläschchen, 50 Teststreifen.

LITERATURNACHWEIS: 5. "References" im englischen Text.

**BD BBL MGIT**  
**Provetta per l'indicazione di crescita dei micobatteri 7 mL**  
**Con kit di supplemento BACTEC MGIT 960**

Italiano

USO PREVISTO

La provetta BBL MGIT per l'indicazione di crescita dei micobatteri, arricchita con il supplemento di crescita BACTEC MGIT e con la miscela antibiotica BBL MGIT PANTA, è indicata per la ricerca e l'isolamento dei micobatteri mediante i sistemi BACTEC MGIT 960 e BACTEC MGIT 320. I tipi di campioni che si prestano al test sono i campioni clinici digeriti e decontaminati (ad eccezione delle urine) e i liquidi biologici sterili (ad eccezione del sangue).

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

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

Gli U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) hanno esteso ai laboratori la raccomandazione di impiegare ogni sforzo per adottare i metodi più rapidi a disposizione per l'analisi diagnostica dei Micobatteri. Tali raccomandazioni comprendono l'utilizzo di un terreno liquido e di uno solido per la coltura di micobatteri.<sup>3,4</sup>

La provetta **MGIT** per l'indicazione di crescita dei micobatteri contiene 7 mL di Brodo di base Middlebrook 7H9 modificato.<sup>5,6</sup> Il terreno completo, con arricchimento OADC e miscela antibiotica **PANTA**, è uno dei brodi più comunemente usati per la coltivazione dei micobatteri.

Qualsiasi tipo di campione clinico, polmonare, extra-polmonare (ad eccezione del sangue ed urina), può essere sottoposto a trattamento per l'isolamento primario nella provetta **MGIT**, mediante i metodi tradizionali.<sup>4</sup> Il campione trattato viene inoculato in una provetta **MGIT**, inserito nello strumento **BACTEC MGIT** e monitorato in continuazione finché non risulta positivo o fino a completamento del protocollo di analisi.

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Un composto fluorescente è incapsulato nel silicone posto sul fondo delle provette circolari da 16 x 100 mm. Il composto fluorescente è sensibile alla presenza dell'ossigeno sciolto nel brodo. All'inizio, la grande quantità di ossigeno contenuto nel terreno riduce le emissioni del composto e si nota solo una debole fluorescenza. In un secondo tempo, i microrganismi che respirano attivamente consumano l'ossigeno e permettono di osservare la fluorescenza.

Le provette inserite nello strumento **BACTEC MGIT** vengono incubate a 37 °C per un periodo ininterrotto e monitorate ogni 60 minuti per rilevarne l'aumento di fluorescenza. L'analisi della fluorescenza viene usata per determinare se la provetta è positiva per lo strumento, vale a dire se il campione contiene organismi vivi. Una provetta positiva per lo strumento contiene tra 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> circa di Unità Formanti Colonie per millilitro (UFC/mL). I flaconi di coltura che rimangono negativi per un minimo di 42 giorni (fino a 56 giorni) e che non mostrano alcun segno di positività vengono tolti dallo strumento in quanto negativi, sterilizzati e poi eliminati.

Ad ogni provetta **MGIT** viene aggiunto il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** che fornisce sostanze essenziali alla crescita rapida dei micobatteri. L'acido oleico viene utilizzato dai bacilli della tubercolosi e riveste un ruolo importante nel metabolismo dei micobatteri. L'albumina agisce quale agente protettivo legando gli acidi grassi liberi, tossici per le specie *Mycobacterium*, favorendo così il loro isolamento. Il destrosio è fonte di energia. La catalasi distrugge i perossidi tossici che potrebbero essere presenti nel terreno di coltura.

La contaminazione può essere ridotta arricchendo il brodo di base **BBL MGIT** con il supplemento di crescita **BACTEC MGIT**/la miscela antibiotica **BBL MGIT PANTA**, prima dell'inoculo del campione clinico.

## REAGENTI

La provetta **BBL MGIT** per l'indicazione di crescita dei micobatteri contiene: 110 µL di indicatore fluorescente e 7 mL di brodo di coltura. L'indicatore contiene Tris 4, 7-difenil-1, 10-fenantroline cloruro di rutenio pentaidrato, in una base di gomma al silicone. Le provette contengono CO<sub>2</sub> al 10% e sono chiuse con tappi di polipropilene.

Formula approssimata \* per L di acqua purificata:

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

Il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** contiene 15 mL di arricchimento OADC Middlebrook.

Formula approssimata \* per L di acqua purificata:

Albumina bovina .....	50,0 g	Catalasi .....	0,03 g
Destrosio .....	20,0 g	Acido oleico .....	0,1 g
Poliosietilene stearato (POES) .....	1,1 g		

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

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

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

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

**Conservazione dei reagenti:** Provette **BBL MGIT**, indicatori della crescita di Micobatteri – Al ricevimento, riporre a 2 – 25° C. **NON CONGELARE.**

Minimizzare l'esposizione alla luce. Il brodo di coltura deve essere limpido e incolore. Non usare se torbido. Le provette **MGIT** conservate secondo le indicazioni fino al momento dell'uso possono essere inoculate fino alla data di scadenza e incubate per un periodo massimo di otto settimane.

Supplemento di crescita **BACTEC MGIT** – Al ricevimento, riporre al buio a 2 – 8° C. Evitare il congelamento o il surriscaldamento. Non aprire fino al momento dell'uso. Minimizzare l'esposizione alla luce.

Miscela antibiotica **BBL MGIT PANTA** – Al ricevimento, riporre le fiale liofilizzate a 2 – 8° C. Una volta ricostituita, la miscela **PANTA** deve essere conservata a 2 – 8° C e utilizzata entro 5 giorni.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*.

Prodotto contenente gomma naturale allo stato secco.

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".<sup>7-10</sup> Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Quando si lavora con una coltura di *Mycobacterium tuberculosis*, si richiedono le pratiche di sicurezza biologica di livello 3 e tutte le apparecchiature e attrezzature adatte al caso.<sup>4</sup>

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

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

In caso di rottura di una provetta: 1) chiudere i cassetti dello strumento; 2) spegnere lo strumento; 3) evacuare la zona immediatamente; 4) consultare le norme del laboratorio/le linee guida del CDC. Una fiala inoculata rotta o con perdite può produrre un aerosol di micobatteri, perciò bisogna manipolarla in modo adeguato.

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

## RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Tutti i campioni devono essere prelevati e trasportati secondo le modalità stabilite dal CDC, dal *Clinical Microbiology Procedures Handbook* o dal regolamento in vigore presso il laboratorio locale.<sup>11</sup>

## DIGESTIONE, DECONTAMINAZIONE E CONCENTRAZIONE

I campioni provenienti dalle diverse parti del corpo devono essere trattati per l'inoculo con il Sistema **MGIT** nel modo seguente:

**ESPETTORATO:** I campioni devono venir trattati con il procedimento che usa NALC-NaOH, come raccomandato dal CDC nel *Public Health Microbiology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup> Come alternativa, usare il kit **BBL MycoPrep** per il trattamento di campioni micobatterici (vedere "Disponibilità").

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

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

**TESSUTO:** I campioni di tessuto devono essere trattati secondo la procedura raccomandata dal CDC nel *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

L'inoculo routinario di terreni solidi è molto importante per il recupero ottimale di Micobatteri dai campioni di tessuto, poiché l'isolamento di organismi da questo tipo di campioni può essere soggetto ad un'alta variabilità.

**CAMPIONI FECALI:** Sospendere 1 g di feci in 5 mL di Brodo Middlebrook. Centrifugare la sospensione in un vortex per 5 sec. Procedere usando NALC-NaOH come raccomandato dal CDC nel *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

**NOTA:** Per tutti i metodi di trattamento dei campioni si deve usare una soluzione di tampone fosfato (pH 6,8), quanto basta per ottenere 50 mL di miscela di decontaminazione prima della centrifugazione. La risospensione del sedimento deve essere effettuata usando una soluzione di tampone fosfato (pH 6,8) preparata di fresco.

## PROCEDURA

**Materiali forniti:** Provette **BBL MGIT** per l'indicazione di crescita dei micobatteri e kit per supplemento **BACTEC MGIT 960**, contenente il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** e la miscela antibiotica **BBL MGIT PANTA** (vedere "Disponibilità").

**Materiali non forniti:** Provette per centrifuga da 50 mL **Falcon**, idrossido di sodio al 4%, soluzione di citrato di sodio al 2,9%, polvere di N-acetil-L-cisteina, tampone fosfato pH 6,8, vortex, incubatore a 37 °C, pipette sterili da 1 mL, pipette sterili da trasporto, Agar **BBL Middlebrook** e Cohn 7H10, **BBL MycoPrep**, kit per digestione/decontaminazione di campioni, Brodo **BBL Middlebrook 7H9** (vedere "Disponibilità") o altri agar o terreni a base d'uovo per Micobatteri; omogeneizzatore di tessuti o tampone sterile, soluzione salina normale **BBL** (vedere "Disponibilità"), microscopio e materiali per la colorazione di vetrini, pipettatore regolabile da 1000 µL e relativi puntali sterili, piastre agar con sangue di montone al 5% e disinfettante tubercolidica.

## INOCULO DELLE PROVETTE MGIT:

Le provette **BBL MGIT** da 7 mL devono essere usate con lo strumento **BACTEC MGIT**.

1. Ricostituire una fiala liofilizzata di miscela antibiotica **BBL MGIT PANTA** con 15 mL di supplemento di crescita **BACTEC MGIT**.
2. Contrassegnare la provetta **MGIT** col numero del campione.
3. Svitare il tappo e aggiungere sterilmente 0,8 mL di supplemento di crescita/miscela antibiotica **MGIT PANTA**. Per ottenere risultati ottimali, l'aggiunta di supplemento di crescita/miscela antibiotica **MGIT PANTA** deve avvenire immediatamente prima dell'inoculo del campione.
4. Aggiungere 0,5 mL di sospensione concentrata del campione preparata in precedenza. Aggiungere anche una goccia di campione (0,1 mL) su una piastra agar 7H10 o altro agar solido o terreno a base d'uovo per Micobatteri.
5. Riavvitare bene il tappo e miscelare accuratamente.
6. Le provette inserite nello strumento saranno analizzate automaticamente per tutta la durata raccomandata del protocollo di test, cioè 42 giorni.

Per i campioni in cui si sospetta la presenza di Micobatteri con esigenze di incubazione diverse, preparare un duplicato della provetta **MGIT** e incubarlo alla temperatura idonea, es. 30 °C o 42 °C. Inoculare ed incubare alla temperatura richiesta. Queste provette devono essere lette manualmente (consultare il *Manuale d'uso dello strumento BACTEC MGIT*).

Se si sospetta che un campione possa contenere *Mycobacterium haemophilum*, si deve introdurre nella provetta una sostanza contenente emina al momento dell'inoculo e poi incubare la provetta a 30 °C. Usando una tecnica sterile, porre una striscia **BBL Taxo** a fattore X in ogni provetta **MGIT** che richiede l'aggiunta di emina, prima di inoculare il campione (vedere "Disponibilità"). Queste provette devono essere lette manualmente (consultare il *Manuale d'uso dello strumento BACTEC MGIT*).

7. Le provette identificate come positive dallo strumento **BACTEC MGIT** devono essere sottoposte a coltura secondaria e si deve allestire un vetrino per l'acido-resistenza (vedere "Risultati").

**Ogni prova per il controllo di qualità, ogni ripetizione di trattamento, preparazione di vetrini, subcoltura, ecc. di provette ritenute positive deve essere effettuata con attrezzature e metodi conformi alle norme di sicurezza biologica (BSL) di livello III.**

**Trattamento delle provette MGIT positive:** **NOTA** – Tutte le procedure devono essere eseguite in una cella di sicurezza biologica.

1. Togliere la provetta **MGIT** dallo strumento e trasportarla in altro luogo rispettando le norme sulle attrezzature e sulla sicurezza biologica di livello III.
2. Usando una pipetta sterile da trasporto, prelevare un'aliquota dal fondo della provetta (circa 0,1 mL) per la preparazione di colorazioni (per l'acido-resistenza e colorazione di Gram).
3. Ispezionare il vetrino e le colorazioni. Dare il referto preliminare solo dopo una valutazione del vetrino per l'acido-resistenza.

Dopo sei settimane d'incubazione, esaminare a occhio nudo tutte le provette negative per lo strumento. Se una provetta appare positiva (es. torbidità non omogenea, piccoli coaguli o grumi), si deve eseguire una subcoltura, la colorazione per l'acido-resistenza e, se lo striscio per l'acido-resistenza è positivo, la provetta va considerata positiva. In mancanza di qualsiasi segno di positività, la provetta va sterilizzata ed eliminata.

**Ripetizione del trattamento sulle provette MGIT contaminate:** È possibile decontaminare e concentrare nuovamente le provette **MGIT** contaminate utilizzando la procedura illustrata all'Appendice E - Procedure supplementari, del *Manuale d'uso dello strumento BACTEC MGIT*.

**Controllo di qualità per l'utilizzatore:** Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

Nel sito web di BD sono disponibili dei certificati di controllo qualità. I certificati di controllo qualità riportano i microrganismi di controllo, incluse le colture ATCC specificate nella norma M22-A3 approvata dal CLSI *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.<sup>12</sup>

**NOTA:** Il Brodo Middlebrook 7H9 (supplementato) è esente dai test di controllo qualità a cura dell'utilizzatore ai sensi della norma CLSI M22-A3.<sup>12</sup>

## RISULTATI

Un campione positivo per lo strumento viene identificato come tale dallo strumento **BACTEC MGIT** e confermato mediante un vetrino per l'acido-resistenza.

### RAPPORTO DEI RISULTATI

La positività di una provetta, riscontrata dallo strumento, deve essere confermata dal vetrino per l'acido-resistenza. Il risultato positivo di tale vetrino sta ad indicare la presenza di Micobatteri.

**Se il vetrino per l'acido-resistenza è positivo, eseguire una subcoltura su terreno solido e segnalare come:** Positivo per lo strumento, Positivo al vetrino per l'acido-resistenza, In corso di identificazione.

**Se sono presenti microrganismi diversi dai bacilli acido-resistenti, segnalare come:** Positivo per lo strumento, Negativo al vetrino per l'acido-resistenza, Contaminato.

**Se non sono presenti microrganismi:** Rimettere la provetta nello strumento in quanto ancora negativa e lasciarla dentro fino al completamento delle 5 h di durata del protocollo di prova. Non va dato alcun risultato.

Eseguire una subcoltura, a partire dalla provetta **BBL MGIT**, per le prove d'identificazione e sensibilità ai farmaci.

### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il grado di recupero dei Micobatteri in una provetta **MGIT** dipende dal numero degli organismi presenti nel campione, dai metodi di prelievo, da fattori dipendenti dal paziente, come la presenza di sintomi, la terapia somministrata in precedenza e dal metodo di trattamento del campione.

Si raccomanda la decontaminazione col procedimento a base di N-acetil-L-cisteina idrossido di sodio (NALC-NaOH). Il terreno **BBL MGIT** non è stato testato con nessun altro metodo di decontaminazione. Altre soluzioni di digestione-decontaminazione possono avere effetti dannosi sui Micobatteri.

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

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

È possibile che le provette **MGIT** positive per lo strumento contengano specie non appartenenti ai Micobatteri. Tali specie non micobatteriche possono crescere più dei Micobatteri presenti. Queste provette **MGIT** devono essere decontaminate di nuovo e rimesse in coltura (consultare il *Manuale d'uso*

dello strumento BACTEC MGIT). La ripetizione del trattamento è vivamente raccomandata nel caso di difficoltà di nuovo prelievo del campione originario, come nel caso dei campioni di tessuto.

Le provette MGIT che risultano positive per lo strumento possono contenere una o più specie di Micobatteri. I Micobatteri a crescita rapida possono essere rilevati prima di quelli a crescita lenta; perciò è importante eseguire una coltura secondaria delle provette MGIT positive per assicurare la corretta identificazione di tutti i Micobatteri presenti nel campione.

Poiché il brodo MGIT è un brodo arricchito e poiché l'indicatore MGIT è per natura non selettivo, è importante seguire la procedura indicata per la digestione/decontaminazione, al fine di ridurre il rischio di contaminazione. Per un recupero ottimale dei Micobatteri, è essenziale seguire fedelmente le istruzioni relative alla procedura, compreso il volume d'inoculo raccomandato (0,5 mL).

L'uso della miscela antibiotica PANTA, anche se necessario per tutti i campioni non sterili, può avere effetti inibitori su alcuni Micobatteri.

Sono stati compiuti studi su colture per semina con ventiquattro specie di Micobatteri (ceppi ATCC e selvaggi), usando concentrazioni d'inoculo tra 10<sup>1</sup> e 10<sup>2</sup> UFC/mL. Le specie seguenti si sono rivelate positive con il sistema BACTEC MGIT 960:

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> †	<i>M. phlei</i>	<i>M. trivale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

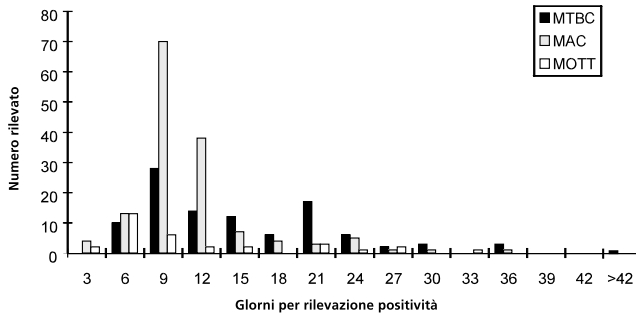
\*Specie isolate nel corso della valutazione clinica del sistema BACTEC MGIT 960. In una delle sedi cliniche è stato isolato anche *M. mucogenicum*.

†*M. haemophilum* è stato isolato grazie all'aggiunta di una sorgente di emina alla provetta MGIT prima dell'inoculo.

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

## VALORI PREVISTI

Figura 1 – Distribuzione della frequenza dei tempi di rilevazione nei campioni sottoposti alle prove cliniche e risultati positivi con il sistema BACTEC MGIT 960



## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Il sistema BACTEC MGIT 960 è stato sottoposto a valutazione in sei sedi cliniche, tra cui una fuori degli Stati Uniti, comprendenti laboratori di igiene pubblica e grossi ospedali di cura intensiva situati in località geografiche diverse. La popolazione esaminata comprendeva pazienti infetti da HIV, pazienti immunocompromessi o che avevano subito trapianti. Il sistema BACTEC MGIT 960 è stato messo a confronto con il sistema radiometrico BACTEC 460TB e con terreni di crescita convenzionali per il rilevamento e il recupero dei Micobatteri da campioni clinici (ad eccezione del sangue). I campioni analizzati durante lo studio sono stati in totale 3330. I campioni positivi sono stati 353, su un totale di 362 isolati recuperati durante lo studio. La distribuzione dei campioni risultati positivi era: campioni respiratori (90%), tessuto (7%), liquidi biologici (1%), feci (0,85%) e midollo (0,65%). Sul totale di 362 isolati, 289 (80%) sono stati rilevati col sistema BACTEC MGIT 960, 271 (75%) col sistema BACTEC 460TB e 250 (69%) mediante terreni solidi convenzionali. Dei 3330 campioni analizzati durante le prove cliniche, 27 provette MGIT 960 (0,8%) si sono rivelate falso positive (positive per lo strumento, negative a striscio e/o subcoltura). Delle 313 provette positive per lo strumento MGIT 960, 27 (8,6%) sono state riscontrate falso positive. Il tasso di falso negatività (negativo per lo strumento, positivo a striscio e/o subcoltura) è stato dello 0,5%, in base alle subcolture terminali di ~ 15% delle provette negative per lo strumento. Il tasso medio di contaminazione per il sistema BACTEC MGIT 960 è stato dell'8,1%, con un range di 1,8 – 14,6%.

TABELLA 2 Isolati positivi alla presenza di Micobatteri nelle valutazioni cliniche

Isolato	Totale	Totale	MGIT	Totale	BACTEC 460TB	Totale	CONV
	Isolati	MGIT 960	solamente	BACTEC 460TB	solamente	CONV	solamente
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
<i>Mycobacteria</i> spp.	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. gordonae</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
Tutti i MICO	362	289	54	271	27	250	16

**DISPONIBILITÀ**

N. di cat.	Descrizione	N. di cat.	Descrizione
245122	Provette <b>BBL MGIT</b> per l'indicazione di crescita dei micobatteri, 7 mL, confezione da 100 provette.	240862	Kit <b>BBL MycoPrep</b> per digestione/decontaminazione di campioni, dieci flaconi da 75 mL di soluzione NALC-NaOH e 5 confezioni di tampone fosfato.
245124	Kit per supplemento <b>BACTEC MGIT 960</b> , contenente 6 fiale da 15 mL di supplemento di crescita <b>BACTEC MGIT</b> e 6 fiale di miscela antibiotica liofilizzata <b>BBL MGIT PANTA</b> . Ogni fiala di supplemento di crescita/ <b>PANTA</b> è sufficiente per 15 - 18 provette <b>MGIT</b> .	240863	Kit <b>BBL MycoPrep</b> per digestione/decontaminazione di campioni, dieci flaconi da 150 mL di soluzione NALC-NaOH e 10 confezioni di tampone fosfato.
220908	Bechi di clarino <b>BBL</b> per terreno Lowenstein-Jensen, confezione da 10 (provette da 20 x 148 mm, con tappo).	221174	Agar <b>BBL Middlebrook</b> e Cohn 7H10, confezione da 20.
220909	Bechi di clarino <b>BBL</b> per terreno Lowenstein-Jensen, confezione da 100 (provette da 20 x 148 mm, con tappo).	295939	Brodo <b>BBL Middlebrook 7H9</b> , 8 mL, confezione da 10 provette.
		221818	Soluzione salina normale <b>BBL</b> , 5 mL, confezione da 10.
		221819	Soluzione salina normale <b>BBL</b> , 5 mL, confezione da 100.
		231106	Strisce <b>BBL Taxo</b> a fattore X, 1 flacone, 50 strisce.

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

# **BD BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL Com BACTEC MGIT 960 Supplement Kit

Português

**USO A QUE SE DESTINA**

O **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube (Tubo Indicador de Crescimento de Micobactérias 7 mL) suplementado com **BACTEC MGIT** Growth Supplement e **BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture destina-se à detecção e isolamento de micobactérias utilizando os sistemas **BACTEC MGIT 960** e **BACTEC MGIT 320**. Os tipos de amostras aceitáveis são amostras clínicas digeridas e descontaminadas (excepto urina) e líquidos corporais estéreis (excepto sangue).

**RESUMO E EXPLICAÇÃO**

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

O Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controlo e Prevenção de Doenças) (CDC) dos E.U. recomendou aos laboratórios que efectuassem todos os esforços no sentido de utilizarem os métodos mais rápidos disponíveis para o teste de diagnóstico de micobactérias. Estas recomendações incluem a utilização de um meio líquido e de um meio sólido para a cultura de micobactérias.<sup>3,4</sup>

O **MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contém 7 mL de base de Meio Líquido Middlebrook 7H9 modificado.<sup>5,6</sup> O meio completo, enriquecido com OADC e com a **PANTA** antibiotic mixture, é um dos meios líquidos mais frequentemente utilizados para a cultura de micobactérias.

Todos os tipos de amostras clínicas, pulmonares e extrapulmonares (excepto sangue e urina) podem ser processadas para o isolamento primário no tubo **MGIT** utilizando os métodos convencionais.<sup>4</sup> A amostra processada é inoculada dentro de um tubo **MGIT**, colocada dentro do instrumento **BACTEC MGIT**, sendo efectuada a monitorização contínua até a amostra ser positiva ou até ao fim do protocolo do teste.

**PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO**

No fundo dos tubos de 16 x 100 mm com fundo redondo existe um composto fluorescente envolvido em silicone. O composto fluorescente é sensível à presença de oxigénio dissolvido no caldo. Inicialmente, a grande quantidade de oxigénio dissolvido anula as emissões provenientes do composto sendo detectada apenas uma pequena quantidade de fluorescência. Posteriormente, a respiração activa dos microrganismos consome o oxigénio e permite que a fluorescência seja detectada.

Os tubos introduzidos dentro do instrumento **BACTEC MGIT** são incubados, de forma contínua, a 37°C e monitorizados a cada 60 min relativamente ao aumento da fluorescência. A análise da fluorescência é utilizada para determinar se o tubo apresenta um resultado positivo no instrumento; ou seja, se a amostra testada contém organismos viáveis. Um tubo com resultado positivo no instrumento contém cerca de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colónia por mililitro (UFC/mL). Os frascos de cultura que se mantêm negativos durante um período mínimo de 42 dias (até 56 dias) e que não apresentem sinais visíveis de positividade são retirados do instrumento como sendo negativos e são esterilizados antes de serem eliminados.

O **BACTEC MGIT** Growth Supplement é adicionado a cada tubo **MGIT** para fornecer substâncias essenciais para o crescimento rápido de micobactérias. O ácido oleico é utilizado pelas bactérias da tuberculose e desempenha um papel importante no metabolismo das micobactérias. A albumina actua como agente protector, ligando-se aos ácidos gordos livres que podem ser tóxicos para as espécies de *Mycobacterium*, melhorando assim o seu isolamento. A dextrose é uma fonte de energia. A catalase destrói os peróxidos tóxicos que possam estar presentes no meio.

A contaminação é reduzida quando, antes da inoculação com uma amostra clínica, a base de meio líquido **BBL MGIT** é suplementada com o **BACTEC MGIT** Growth Supplement/**BBL MGIT PANTA** antibiotic mixture.

**REAGENTES**

O **BBL MGIT** Mycobacteria Growth Indicator Tube contém: 110 µL de indicador fluorescente e 7 mL de meio líquido. O indicador contém Tris 4, 7-difenil-1, pentahidrato de cloreto de ruténio de 10-fenantrolina numa base de borracha de silicone. Os tubos são purgados com CO<sub>2</sub> a 10% e fechados com tampas de polipropileno.

Fórmula Aproximada\* Por Litro de Água Purificada

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

O **BACTEC MGIT** Growth Supplement é enriquecido com 15 mL de Middlebrook OADC.

Fórmula Aproximada\* Por Litro de Água Purificada

Albumina bovina.....	50,0 g	Catalase .....	0,03 g
Dextrose.....	20,0 g	Ácido oleico.....	0,1 g
Estearato de polioxietileno (POES) .....	1,1 g		

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

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

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

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

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

**BACTEC MGIT Growth Supplement** - Após a recepção, armazene entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz. Evite congelar ou aquecer excessivamente. Abra apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz.

**BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture** - Após a recepção, armazene os frascos liofilizados entre 2 e 8°C. Logo que seja reconstituída, a mistura **PANTA** deve ser armazenada entre 2 e 8°C e utilizada num período de 5 dias.

#### AVISOS E PRECAUÇÕES

Para uso em 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"<sup>7-10</sup> e as linhas de orientação da instituição.

Para trabalhar com o *Mycobacterium tuberculosis* cultivado em meio de cultura são exigidas práticas, equipamentos de contenção e instalações de Nível 3 de Biosegurança.<sup>4</sup>

Antes de ser utilizado, cada tubo **MGIT** deve ser examinado relativamente a contaminação ou danos. Elimine todos os tubos que pareçam alterados.

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

Em caso de quebra do tubo: 1) Fechar as gavetas do instrumento; 2) Desligar o instrumento; 3) Desocupar a área de imediato; 4) Consultar as normas da instituição/CDC. Um frasco inoculado que apresente fugas ou se encontre partido pode produzir aerossóis de micobactérias; o frasco deverá ser manipulado de forma apropriada.

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

#### RECOLHA E MANUSEAMENTO DAS AMOSTRAS

A colheita e o transporte de todas as amostras devem ser efectuados de acordo com as recomendações do CDC, do *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (Manual de Procedimentos de Microbiologia Clínica) ou do manual de procedimentos do seu laboratório.<sup>11</sup>

#### DIGESTÃO, DESCONTAMINAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

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

**SALIVA:** As amostras devem ser processadas utilizando o método de NALC-NaOH, tal como é recomendado pela publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory* (Mycobacteriologia de Saúde Pública: Um Guia para o Laboratório de Nível III)<sup>4</sup> Em alternativa, utilize o **BBL MycoPrep** kit para o processamento de amostras de micobactérias (consulte a secção "Disponibilidade").

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

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

**TECIDOS:** As amostras de tecidos devem ser processadas de acordo com as recomendações da publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

A inoculação de rotina de meios sólidos é especialmente importante para o isolamento óptimo de micobactérias a partir de amostras de tecidos, uma vez que estes tipos de amostras são particularmente susceptíveis ao isolamento esporádico de organismos.

**FEZES:** Suspenda 1 g de fezes em 5 mL de Meio Líquido Middlebrook. Agite a suspensão num misturador vortex durante 5 s. Prossiga com o procedimento NALC-NaOH, tal como é recomendado pela publicação do CDC, *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

**NOTA:** Para todos os métodos de processamento das amostras, deve ser adicionada uma solução de tampão fosfato (pH 6,8) à mistura descontaminante q.b.p. 50 mL, antes da centrifugação. A resuspensão do concentrado também deve ser efectuada utilizando uma preparação fresca de solução de tampão fosfato (pH 6,8).

#### PROCEDIMENTO

**Material Fornecido:** **BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tubes** e **BACTEC MGIT 960 Supplement Kit** contendo o **BACTEC MGIT Growth Supplement** e o **BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture** (consulte a secção "Disponibilidade").

**Material Necessário mas Não Fornecido:** Tubos de centrifuga de 50 mL da marca Falcon, hidróxido de sódio a 4%, solução de citrato de sódio a 2,9%, N-acetil-L-cisteína em pó, tampão fosfato, pH 6,8, misturador vortex, incubadora a 37°C, pipetas estéreis de 1 mL, pipetas de distribuição estéreis, Agar **BBL Middlebrook** e Cohn 7H10, **BBL MycoPrep Specimen Digestion / Decontamination Kit** (Kit de Digestão / Descontaminação das Amostras **MycoPrep BBL**), **BBL Middlebrook 7H9 Broth** (Meio Líquido Middlebrook 7H9 **BBL**) (consulte a secção "Disponibilidade") ou outros agares ou meios à base de ovo para micobactérias. Homogeneizador de tecidos ou esfregaço estéril, **BBL Normal Saline** (Solução Salina Normal **BBL**) (consulte a secção "Disponibilidade"), microscópio e materiais para a coloração de lâminas, pipetador de 1000 µL regulável, pontas de pipetas estéreis correspondentes, placas de agar com sangue de ovino a 5% e desinfetante tuberculocida.

#### INOCULAÇÃO DOS TUBOS MGIT

Os tubos **BBL MGIT 7 mL** devem ser utilizados com um instrumento **BACTEC MGIT**.

1. Reconstitua um frasco liofilizado da **BBL MGIT PANTA Antibiotic Mixture** com 15 mL de **BACTEC MGIT Growth Supplement**.

2. Identifique o tubo **MGIT** com o número da amostra.

3. Desenrosque a tampa e adicione, de forma asséptica, 0,8 mL de Growth Supplement/**MGIT PANTA Antibiotic Mixture**. Para obter melhores resultados, a adição do Growth Supplement/**MGIT PANTA Antibiotic Mixture** deverá ser efectuada momentos antes da inoculação da amostra.

4. Adicione 0,5 mL da suspensão de amostra concentrada preparada conforme é indicado em cima. Adicione também uma gota (0,1 mL) de amostra a uma placa de agar 7H10 ou a outro agar sólido ou meio à base de ovo para micobactérias.

5. Volte a colocar a tampa no tubo, aperte e misture bem.

6. Os tubos introduzidos dentro do instrumento serão automaticamente testados durante o protocolo de teste com 42 dias de duração recomendado.

Para as amostras nas quais se suspeita da existência de micobactérias com diferentes necessidades de incubação, pode ser preparado outro tubo **MGIT**, o qual será incubado à temperatura apropriada; por exemplo, 30 ou 42°C. Inocule e incube à temperatura exigida. Estes tubos devem ser lidos manualmente (consulte o *Manual do Utilizador* do instrumento **BACTEC MGIT**).

Para as amostras nas quais se suspeita da existência de *Mycobacterium haemophilum*, deverá ser introduzida dentro do tubo, no momento da inoculação, uma fonte de hemina; o tubo deverá ser incubado a 30°C. Antes de inocular a amostra, coloque, de forma asséptica, uma tira de **BBL Taxo X factor strip** (tiras do factor X **Taxo BBL**) dentro de cada um dos tubos **MGIT** em que é necessária a adição de hemina (consulte a secção "Disponibilidade"). Estes tubos devem ser lidos manualmente (consulte o *Manual do Utilizador* do instrumento **BACTEC MGIT**).

7. A partir dos tubos identificados como positivos pelo instrumento **BACTEC MGIT**, deverá ser efectuada uma repicagem e deverá ser preparada uma coloração ácida rápida (consulte a secção "Resultados").

**Todos os testes de controlo da qualidade, reprocessamento, preparação de esfregaços, repicagens, etc., de tubos presumivelmente positivos devem ser efectuados utilizando práticas de biossegurança de nível (BSL) III e instalações de isolamento.**

**Processamento de um Tubo MGIT Positivo:** NOTA - Todos os passos devem ser executados numa câmara de segurança biológica.

1. Retire o tubo **MGIT** do instrumento e transporte-o para um área utilizando práticas e instalações de contenção BSL III (Nível de Biosegurança III).

2. Utilizando uma pipeta de distribuição estéril, retire uma alíquota do fundo do tubo (aproximadamente 0,1 mL) para a realização das preparações coradas (colorações AFB e Gram).

3. Inspeccione o esfregaço e as preparações. Efectue o relatório dos resultados preliminares apenas após a avaliação da coloração ácida rápida.

No fim do período de seis semanas de incubação, inspeccione visualmente todos os tubos negativos existentes no instrumento. Se, o tubo apresentar sinais de positividade (ou seja, turvação não homogénea, pequenos grumos ou colónias), deverá ser efectuada uma repicagem, uma coloração ácida

rápida e o tubo deverá ser tratado como sendo presuntivamente positivo, desde que o resultado do esfregaço com coloração ácida rápida seja positivo. Se o tubo não apresentar sinais de positividade, deverá ser esterilizado antes de ser eliminado.

**Reprocessamento dos tubos MGIT Contaminados:** Os tubos **MGIT** contaminados podem voltar a ser descontaminados e concentrados utilizando o procedimento no Anexo E - Procedimentos Suplementares do *Manual do Utilizador* do instrumento **BACTEC MGIT**.

**Controlo de Qualidade do Utilizador:** Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. O utilizador deve consultar as orientações CLSI e os regulamentos CLIA relevantes sobre as práticas de Controlo da Qualidade adequadas.

O site da BD na internet fornece Certificados do Controlo de Qualidade. Os Certificados do Controlo de Qualidade contêm uma lista dos organismos para teste, incluindo as culturas ATCC especificadas na norma M22-A3 aprovada CLSI, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.<sup>12</sup>

NOTA: O caldo Middlebrook 7H9 (suplementado) está isento de testes de controlo de qualidade do utilizador, em conformidade com a norma CLSI M22-A3.<sup>12</sup>

## RESULTADOS

A determinação da positividade de uma amostra no instrumento é efectuada pelo instrumento **BACTEC MGIT** e é confirmada por um esfregaço com coloração ácida rápida.

### PARTICIPAÇÃO DOS RESULTADOS

Um tubo positivo no instrumento deve ser confirmado por um esfregaço com coloração ácida rápida. Um esfregaço com coloração AFB com um resultado positivo indica a presença de micobactérias.

**Se o esfregaço for AFB positivo, efectue uma repicagem para um meio sólido e descreva como:** Positivo no instrumento, esfregaço AFB positivo, ID pendente.

**Se existirem outros microorganismos além de AFB, descreva como:** Positivo no instrumento, esfregaço AFB negativo. Contaminado.

**Se não existirem microorganismos:** Volte a introduzir o tubo dentro do instrumento, como um tubo negativo pendente, no máximo até 5 h após a remoção. Permita a conclusão do protocolo do teste do tubo. Sem resultado a relatar.

Efectue uma repicagem a partir do tubo **BBL MGIT** para a identificação e teste da susceptibilidade a fármacos.

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

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

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

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

Os tubos **MGIT** que são positivos no instrumento podem conter outras espécies além de micobactérias. O crescimento de outras espécies pode sobrepor-se ao das micobactérias presentes. Deve ser efectuada uma nova descontaminação e nova cultura destes tubos **MGIT** (consulte o *Manual do Utilizador* do instrumento **BACTEC MGIT**). Recomenda-se veemente a repetição do processamento caso não possa ser facilmente efectuada uma nova colheita da fonte original da amostra; por exemplo, amostra de tecidos.

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

Devido à riqueza do meio líquido **MGIT** e à natureza não selectiva do indicador **MGIT**, deverá cumprir o procedimento de digestão/descontaminação descrito para diminuir a possibilidade de contaminação. O cumprimento das instruções do procedimento, as quais incluem a utilização de um volume de inóculo recomendado (0,5 mL) é crucial para a optimização do isolamento de micobactérias.

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

Os estudos das culturas semeadas foram efectuados com vinte e quatro espécies (ATCC e estirpes selvagens) de micobactérias utilizando níveis de inóculo que variaram entre  $10^1$  e  $10^2$  UFC/mL. As espécies seguintes foram detectadas como positivas no Sistema **BACTEC MGIT 960**:

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> <sup>†</sup>	<i>M. phlei</i>	<i>M. trivale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

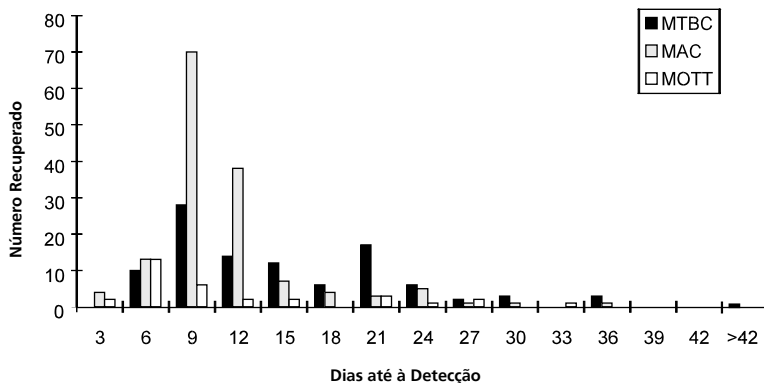
\*Espécies isoladas durante a avaliação clínica do Sistema **BACTEC MGIT 960**. Além disso, o *M. mucogenicum* foi isolado em um dos locais clínicos.

<sup>†</sup>O *M. haemophilum* foi isolado através da adição de uma fonte de hemina ao tubo **MGIT**, antes da inoculação.

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

### VALORES ESPERADOS

Figura 1 – Distribuição da frequência dos tempos de recuperação para as amostras do ensaio clínico positivos no Sistema **BACTEC MGIT 960**



### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

O Sistema **BACTEC MGIT 960** foi avaliado em seis locais clínicos, incluindo um local fora dos EU, representando laboratórios de saúde pública, assim como hospitais de grandes dimensões em diversas áreas geográficas. A população local incluiu doentes infectados com o VIH, doentes imunodeprimidos e doentes transplantados. O Sistema **BACTEC MGIT 960** foi comparado com o sistema radiométrico **BACTEC 460TB**, e com meios de

crecimiento sólidos convencionales para a detección e isolamento de micobacterias en amostras clínicas, excepto sangue. Durante o estudo, foram testadas um total de 3330 amostras. Durante o estudo, um total de 353 amostras foram positivas, o que representou a detección de 362 isolados. A distribución dos resultados positivos de acordo com o tipo de amostra é: aparelho respiratório (90%), tecidos (7%), líquidos corporais (1%), fezes (0,85%) e medula óssea (0,65%). Dos 362 isolados, 289 (80%) foram isolados pelo Sistema **BACTEC MGIT 960**, 271 (75%) foram isolados pelo Sistema **BACTEC 460TB** e 250 (69%) foram isolados pelos meios sólidos convencionais. Das 3330 amostras testadas no estudo clínico, 27 (0,8%) tubos **MGIT 960** eram falsos positivos (positivo no instrumento, negativo no esfregaço e/ou na repicagem). Dos 313 tubos positivos no instrumento **MGIT 960**, 27 (8,6%) eram falsos positivos. A taxa de falsos negativos (negativos no instrumento, positivos no esfregaço e/ou na repicagem) foi de 0,5% baseada nas repicagens terminais de 15% de frascos negativos no instrumento. A taxa média de contaminação por sobreposição para o Sistema **BACTEC MGIT 960** foi de 8,1% com uma variação entre 1,8 e 14,6%.

**Quadro 2: Detección de Isolados Positivos de Micobacterias nas Avaliações Clínicas**

Isolados	Total de isolados	Total <b>MGIT 960</b>	Apenas <b>MGIT</b>	Total <b>BACTEC 460TB</b>	Apenas <b>BACTEC 460TB</b>	Total CONV	Apenas CONV
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
Micobacterias spp.	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. gordonae</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
Todas MICO	362	289	54	271	27	250	16

#### DISPONIBILIDADE

##### No. de cat. Descrição

245122	<b>BBL MGIT</b> Mycobacteria Growth Indicator Tubes, 7 mL, caixa de 100 tubos
245124	<b>BACTEC MGIT 960</b> Supplement Kit, 6 frascos, 15 mL, <b>BACTEC MGIT</b> Growth Supplement e 6 frascos, liofilizados, de <b>BBL MGIT PANTA</b> Antibiotic Mixture. Cada frasco de Suplemento de Crescimento/ <b>PANTA</b> é suficiente para 15 - 18 <b>MGIT</b> tubes.
220908	<b>BBL</b> Lowenstein-Jensen Medium Slants, embalagem de 10 (tubos de 20 x 148 mm com tampa).
220909	<b>BBL</b> Lowenstein-Jensen Medium Slants, caixa de 100 (tubos de 20 x 148 mm com tampa).
240862	<b>BBL MycoPrep</b> Specimen Digestion/Decontamination Kit (Kit de Digestão/Descontaminação de Amostras <b>BBL MycoPrep</b> ), dez frascos de 75 mL de Solução NALC-NaOH e 5 embalagens de tampão de fosfato.
240863	<b>BBL MycoPrep</b> Specimen Digestion/Decontamination Kit, dez frascos de 150 mL de Solução NALC-NaOH e 10 embalagens de tampão de fosfato.
221174	<b>BBL</b> Middlebrook and Cohn 7H10 Agar, embalagem de 20.
295939	<b>BBL</b> Middlebrook 7H9 Broth, 8 mL, embalagem de 10 tubos.
221818	<b>BBL</b> Normal Saline, 5 mL, embalagem de 10.
221819	<b>BBL</b> Normal Saline, 5 mL, caixa de 100.
231106	<b>BBL Taxo X</b> Factor Strips, 1 Frasco de 50 Tiras.

**REFERÊNCIAS:** Consulte "Referencias" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Registrado no Brasil por:

Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda

Av. Presidente Juscelino Kubitschek, 273 Juiz de Fora - MG - Brasil

CNPJ 21.551.379/0001-06

Registro ANVISA nº 10033430437 (Tubo Indicador de Crescimento de Micobacterias, 7 mL)

Registro ANVISA nº 10033430418 (BACTEC MGIT 960 Supplement Kit)

Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555654

## **BD BBL MGIT** Tubo indicador de crescimento micobacteriano 7 mL Con kit de suplemento BACTEC MGIT 960

Español

#### USO PREVISTO

El tubo **BBL MGIT** indicador de crecimiento micobacteriano enriquecido con el suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** y la mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** está destinado para la detección y recuperación de micobacterias utilizando los sistemas **BACTEC MGIT 960** y **BACTEC MGIT 320**. Los tipos de muestras aceptables son muestras clínicas digeridas y descontaminadas (excepto orina) y fluidos corporales estériles (excepto sangre).

#### RESUMEN Y EXPLICACION

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

Los U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) han recomendado que los laboratorios se esfuercen todo lo posible en utilizar los métodos más rápidos disponibles para el análisis diagnóstico de micobacterias. Estas recomendaciones incluyen la utilización de medios de cultivo tanto líquidos como sólidos para el cultivo de micobacterias.<sup>3,4</sup>

El tubo **MGIT** indicador de crecimiento micobacteriano contiene 7 mL de base de Caldo Middlebrook 7H9 modificado.<sup>5,6</sup> El medio de cultivo completo, con caldo de enriquecimiento OADC y mezcla antibiótica **PANTA**, es uno de los medios líquidos usados más frecuentemente para el cultivo de micobacterias.

Todos los tipos de muestras clínicas, tanto pulmonares como extrapulmonares (excepto sangre y orina), pueden ser procesadas para el aislamiento primario en el tubo **MGIT** utilizando los métodos convencionales.<sup>4</sup> La muestra procesada se inocula en un tubo **MGIT** y se coloca en el instrumento **BACTEC MGIT** para el control continuo hasta obtener una lectura positiva o hasta el final del procedimiento de análisis.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Un compuesto fluorescente está incluido en silicona en la parte inferior de los tubos de 16 x 100 mm de fondo redondo. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Más tarde, los microorganismos que respiran activamente consumen el oxígeno y permiten que se detecte la fluorescencia.

Los tubos que se introducen en el instrumento **BACTEC MGIT** son incubados continuamente a 37 °C y éste controla los tubos cada 60 minutos para detectar un aumento en la fluorescencia. El análisis de la fluorescencia se utiliza para determinar si el instrumento detecta el tubo como positivo, es decir, que la muestra analizada contiene organismos viables. Cada tubo que el instrumento detecta como positivo contiene aproximadamente 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Los frascos de cultivo que permanecen negativos durante un mínimo de 42 días (hasta 56 días) y que no muestran indicios de ser positivos se retiran del instrumento como negativos y se esterilizan antes de ser desechados.

El suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** se añade a cada tubo **MGIT** para proporcionar sustancias esenciales para el crecimiento rápido de micobacterias. El ácido oleico es usado por bacterias tuberculosas y desempeña un papel importante en el metabolismo micobacteriano. La albúmina actúa como agente protector al ligar ácidos grasos libres, los cuales pueden ser tóxicos para las especies *Mycobacterium* y, por lo tanto, ayuda en su recuperación. La dextrosa es una fuente de energía. La catalasa destruye las peroxidases tóxicas que pueden estar presentes en el medio.

La contaminación se reduce al suplementar el caldo de base **BBL MGIT** con el suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT**/mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** antes de la inoculación con una muestra clínica.

#### REACTIVOS

El tubo indicador de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** contiene: 110 µL de indicador fluorescente y 7 mL de caldo. El indicador contiene cloruro pentahidratado de Tris-4, 7-difenil-1, 10-fenantrolina rutenio en una base de silicona. Los tubos se limpian con un chorro de CO<sub>2</sub> al 10% y se cierran con tapones de polipropileno.

Fórmula aproximada\* por L de agua purificada:

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

El suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** contiene 15 mL de Caldo de enriquecimiento Middlebrook OADC.

Fórmula aproximada\* por L de agua purificada:

Albumina bovina .....	50,0 g	Catalasa .....	0,03 g
Dextrosa .....	20,0 g	Ácido oleico .....	0,1 g
Estearato de polioxietileno (POES) .....	1,1 g		

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

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

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

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

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

**Suplemento de crecimiento BACTEC MGIT** – En cuanto lo reciba, guárdelo en un sitio oscuro entre 2 – 8° C. Evite la congelación o el sobrecalentamiento. No los abra hasta el momento de utilizarlos. Reduzca al mínimo la exposición a la luz.

**Mezcla antibiótica BBL MGIT PANTA** – En cuanto los reciba, almacene los frascos liofilizados entre 2 – 8° C. Una vez que se reconstituya, la mezcla **PANTA** debe ser almacenada entre 2 – 8° C y utilizada dentro de 5 días.

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para diagnóstico *in vitro*.

Este producto contiene goma seca natural.

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"<sup>7-10</sup> y las directrices del centro. Esterilizar en autoclave los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado antes de desecharlos.

El trabajo con *Mycobacterium tuberculosis* en cultivo precisa la utilización de prácticas del Nivel de bioseguridad 3 y equipo e instalaciones para contención.<sup>4</sup>

Antes de utilizarlos, inspeccione todos los tubos **MGIT** en busca de indicios de contaminación o deterioro. Deseche todos los tubos que no reúnan las condiciones adecuadas.

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

Si se rompe un tubo: 1) Cierre los cajones del instrumento; 2) Apague el instrumento; 3) Evacúe el área inmediatamente; 4) Consulte las normas de su establecimiento/CDC. Un frasco inoculado roto o que gotea puede producir un aerosol de micobacterias, por lo que se debe emplear una manipulación adecuada.

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

#### RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras deben ser recogidas y transportadas siguiendo las recomendaciones de los CDC, del *Clinical Microbiology Procedures Handbook* del manual de procedimientos de su laboratorio.<sup>11</sup>

#### DIGESTION, DESCONTAMINACION Y CONCENTRACION

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

**ESPUTO:** Las muestras deben ser procesadas utilizando el método NALC-NaOH de acuerdo con las recomendaciones de los CDC en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup> Alternativamente, utilice el equipo **BBL MycoPrep** para el procesamiento de muestras micobacterianas (vea "Disponibilidad").

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

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

**TEJIDO:** Las muestras de tejido deben ser procesadas de acuerdo con las recomendaciones de los CDC en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

Es de especial importancia la inoculación de rutina de medios sólidos para la recuperación óptima de micobacterias a partir de muestras de tejido, puesto que estos tipos de muestras son especialmente susceptibles a la recuperación esporádica de organismos.

**MATERIA FECAL:** Suspenda 1 g de heces en 5 mL de caldo Middlebrook. Agite la suspensión en un agitador vórtex durante 5 seg. Continúe con el procedimiento de NALC-NaOH siguiendo las recomendaciones de los CDC en el *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory*.<sup>4</sup>

**NOTA:** Para todos los métodos de procesamiento de muestras, debe emplearse una solución tampón de fosfato (pH 6,8) para ajustar la cantidad suficiente de la mezcla descontaminante de la muestra a 50 mL antes de centrifugar. La nueva suspensión del sedimento también debe realizarse utilizando una preparación fresca de solución tampón de fosfato (pH 6,8).

## PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados:** Tubos **BBL MGIT** indicadores de crecimiento micobacteriano y kit de suplemento **BACTEC MGIT 960** que contiene suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT** y mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** (vea "Disponibilidad").

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Tubos de centrifugación de 50 mL marca **Falcon**, hidróxido de sodio al 4%, solución de citrato de sodio al 2,9%, N-acetil-L-cisteína en polvo, solución tampón de fosfato pH 6,8, agitador vórtex, incubadora para 37 °C, pipetas estériles de 1 mL, pipetas estériles de transferencia, Agar **BBL Middlebrook** y **Cohn 7H10**, kit para digestión/descontaminación de muestras **BBL MycoPrep**, Caldo **BBL Middlebrook 7H9** (vea "Disponibilidad") u otros medios de cultivo de micobacterias a base de agar o de huevo. Homogenizador de tejidos o torunda estéril, solución salina normal **BBL** (vea "Disponibilidad"), microscopio y materiales para teñir preparaciones en portaobjetos, pipeta ajustable de 1000 µL, puntas estériles de pipetas correspondientes, placas de agar con 5% de sangre de carnero y desinfectante tuberculocida.

## INOCULACIÓN DE LOS TUBOS MGIT

Los tubos de 7 mL **BBL MGIT** deben utilizarse con un instrumento **BACTEC MGIT**.

1. Reconstituya un tubo liofilizado de mezcla antibiótica **BBL MGIT PANTA** con 15 mL de suplemento de crecimiento **BACTEC MGIT**.
  2. Rotule el tubo **MGIT** con el número de la muestra.
  3. Desenrosque el tapón y añada asepticamente 0,8 mL de suplemento de crecimiento/mezcla antibiótica **MGIT PANTA**. Para obtener los mejores resultados, la adición de suplemento de crecimiento/mezcla antibiótica **MGIT PANTA** debe hacerse justo antes de la inoculación de la muestra.
  4. Añada 0,5 mL de la suspensión de muestra concentrada preparada anteriormente. También añada una gota (0,1 mL) de la muestra a una placa de agar 7H10 o a otro medio micobacteriano de agar sólido o a base de huevo.
  5. Vuelva a tapar el tubo firmemente y mezcle bien.
  6. Los tubos que se ponen en el instrumento serán analizados automáticamente durante el procedimiento del análisis recomendado de 42 días.  
Para aquellas muestras en que se sospeche la presencia de micobacterias que tienen necesidades de incubación diferentes, se puede preparar e incubar un segundo tubo **MGIT** a la temperatura apropiada, por ejemplo, 30 o 42 °C. Inocule e incube a la temperatura necesaria. Estos tubos deben leerse manualmente (consulte el *Manual del usuario* del instrumento **BACTEC MGIT**).  
Para aquellas muestras en que se sospeche la presencia de *Mycobacterium haemophilum*, hay que introducir en el tubo una sustancia que contiene hemina en el momento de la inoculación e incubar el tubo a 30 °C. Coloque asepticamente una tira **BBL Taxo** con factor X en cada tubo **MGIT** que requiere la adición de hemina antes de inocular la muestra (vea "Disponibilidad"). Estos tubos deben leerse manualmente (consulte el *Manual del usuario* del instrumento **BACTEC MGIT**).
7. Se deben hacer subcultivos y frotis ácido resistentes a partir de los tubos positivos identificados por el instrumento **BACTEC MGIT** (vea "Resultados").

**Todos los análisis de control de calidad, reprocesamiento, preparación de frotis, subcultivos, etc. de tubos presuntamente positivos deben ser realizados utilizando medios de contención y a un nivel 3 de bioseguridad.**

**Procesamiento de un tubo MGIT positivo:** NOTA – Todos los pasos deben ser efectuados en un gabinete de seguridad biológica.

1. Saque el tubo **MGIT** del instrumento y transporte a un área utilizando medios de contención y prácticas a un nivel 3 de bioseguridad.
2. Utilizando una pipeta de transferencia estéril, saque una alícuota del fondo del tubo (aprox. 0,1 mL) para hacer preparaciones teñidas (tinciones ácidos resistentes y de Gram).
3. Inspeccione el frotis y las preparaciones. Sólo deben comunicarse los resultados preliminares después de evaluar el frotis ácido resistente.

Después de seis semanas de incubación, inspeccione visualmente todos los tubos que el instrumento determina negativos. Si el tubo parece positivo a simple vista (es decir, turbidez no homogénea, gránulos pequeños o flóculos) debe efectuar un subcultivo, frotis ácido resistente y considerarlo presuntamente positivo, siempre que el resultado del frotis ácido resistente sea positivo. Si el tubo no muestra ningún indicio de ser positivo, debe ser esterilizado antes de ser desechado.

**Reprocesamiento de tubos MGIT contaminados:** Los tubos **MGIT** contaminados pueden ser descontaminados y concentrados de nuevo utilizando el procedimiento descrito en el Anexo E - Procedimientos adicionales del *Manual del usuario* del instrumento **BACTEC MGIT**.

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

El sitio web de BD suministra certificados de control de calidad. En los certificados de control de calidad aparecen los organismos de prueba, incluidos los cultivos ATCC especificados en el estándar aprobado del CLSI M22-A3, *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media*.<sup>12</sup>

NOTA: Según el CLSI M22-A3, no es necesario que el usuario realice un control de la calidad del caldo Middlebrook 7H9 (suplementado).<sup>12</sup>

## RESULTADOS

Una muestra positiva por el instrumento se determina utilizando el instrumento **BACTEC MGIT** y se confirma mediante un frotis ácido resistente.

### INFORME DE RESULTADOS

Un tubo que el instrumento detecta como positivo debe ser confirmado mediante un frotis ácido resistente. El resultado positivo de un frotis ácido resistente indica la presencia de micobacterias.

**Si la tinción es positiva para bacilos ácido resistentes, haga un subcultivo en medios sólidos y comuníquelo:** Positivo en el instrumento, tinción de bacilos ácido resistentes positiva, identificación pendiente.

**Si están presentes otros microorganismos además de bacilos ácido resistentes, comuníquelo:** Positivo en el instrumento, tinción de bacilos ácido resistentes negativa, contaminado.

**Si no están presentes otros microorganismos:** Vuelva a poner el tubo en el instrumento como tubo constantemente negativo dentro de 5 h de la extracción. Permita que el tubo complete el procedimiento de análisis. No hay resultado comunicable.

Realice un subcultivo del tubo **BBL MGIT** para hacer la identificación y pruebas de susceptibilidad.

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

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

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

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

Los tubos **MGIT** que el instrumento detecta como positivos pueden contener especies no micobacterianas. Las especies no micobacterianas pueden crecer más que las micobacterias presentes. Estos tubos **MGIT** deben ser descontaminados y cultivados de nuevo (consulte el *Manual del usuario* del instrumento **BACTEC MGIT**). Se recomienda firmemente realizar el reprocesamiento si la fuente de la muestra original no puede volver a extraerse fácilmente, por ejemplo, muestra de tejido.

Los tubos **MGIT** que el instrumento detecta como positivos pueden contener una o más especies de micobacterias. Las micobacterias de crecimiento más rápido pueden ser detectadas antes que las micobacterias de crecimiento más lento; por lo tanto, es importante hacer subcultivos de los tubos **MGIT** positivos para asegurar la identificación adecuada de todas las micobacterias presentes en la muestra.

Debido a la riqueza del caldo **MGIT** y la naturaleza no selectiva del indicador **MGIT**, es importante seguir el procedimiento de digestión/descontaminación descrito para reducir la posibilidad de contaminación. Es importante seguir las instrucciones que acompañan el procedimiento, que incluyen el uso de volumen recomendado de inóculo (0,5 mL), para asegurar una recuperación óptima de micobacterias.

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

Se hicieron estudios de cultivos sembrados con veinticuatro especies (ATCC y cepas salvajes) de micobacterias utilizando niveles de inóculo desde  $10^1$  a  $10^2$  UFC/mL. Las siguientes especies dieron resultados positivos en el sistema BACTEC MGIT 960:

<i>M. avium</i> *	<i>M. gordonae</i> *	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. abscessus</i>	<i>M. haemophilum</i> t	<i>M. phlei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. simiae</i> *	<i>M. tuberculosis</i> *
<i>M. celatum</i>	<i>M. kansasii</i> *	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i> *
<i>M. fortuitum</i> *	<i>M. malmoense</i>	<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. szulgai</i> *	

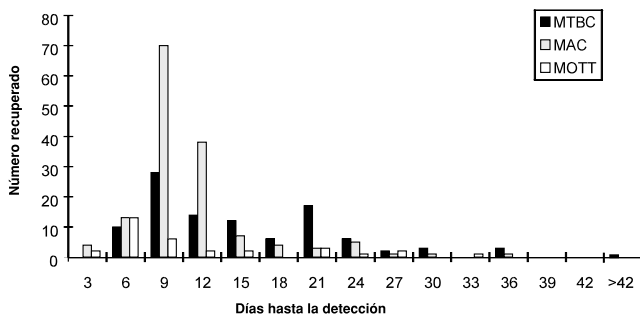
\*Especies recuperadas durante la evaluación clínica del sistema BACTEC MGIT 960. Además, se recuperó *M. mucogenicum* en uno de los centros clínicos.

<sup>t</sup>*M. haemophilum* se recuperó al añadir una fuente de hemina al tubo MGIT antes de la inoculación.

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

#### VALORES ESPERADOS

Figura 1 – Distribución de las frecuencias de los tiempos de recuperación para muestras positivas en ensayo clínico del sistema BACTEC MGIT 960



#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El sistema BACTEC MGIT 960 fue evaluado en seis centros clínicos que incluyeron un centro extranjero, que representaron laboratorios de salud pública y grandes hospitales de asistencia a pacientes agudos, situados en zonas geográficas muy diferentes. La población de los centros incluyó pacientes con infección por VIH, pacientes inmunocomprometidos y pacientes de trasplante. El sistema BACTEC MGIT 960 fue comparado con el sistema radiométrico BACTEC 460TB y medios de cultivo sólidos convencionales para la detección y recuperación de micobacterias de muestras clínicas, excepto sangre. Un total de 3330 muestras fue analizado durante el estudio. Un total de 353 muestras fue positivo, que representó 362 de los aislados recuperados durante el estudio. La distribución de las muestras positivas según el tipo de muestra es: respiratorias (90%), tejido (7%), fluidos corporales (1%), fecales (0,85%) y médula ósea (0,65%). De estos 362 aislados, 289 (80%) fueron recuperados por el sistema BACTEC MGIT 960, 271 (75%) fueron recuperados por el sistema BACTEC 460TB y 250 (69%) fueron recuperados por medios sólidos convencionales. De las 3330 muestras analizadas durante el estudio clínico, se determinó que 27 (0,8%) tubos MGIT 960 eran falsos positivos (positivos en el instrumento, negativos en frotis y/o subcultivo). De los 313 tubos MGIT que el instrumento detectó como positivos, 27 (8,6%) fueron falsos positivos. Se determinó que el porcentaje de falsos negativos (negativos en el instrumento, positivos en frotis y/o subcultivo) fue 0,5% según subcultivos terminales de ~ 15% de frascos que el instrumento detectó como negativos. La tasa media de contaminación hallada en el sistema BACTEC MGIT 960 fue 8,1% con un margen de 1,8% – 14,6%.

TABLA 2: Detección de aislados positivos para micobacterias en evaluaciones clínicas

Aislado	Total aislados	Total MGIT 960	Sólo MGIT	Total BACTEC 460TB	Sólo BACTEC 460TB	Total CONV	Sólo CONV
MTB	132	102	4	119	11	105	3
MAC	172	147	36	123	12	106	3
<i>M. asiaticum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. fortuitum/chelonae</i>	22	18	6	13	1	15	1
<i>M. genavense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. kansasii</i>	5	5	1	4	0	4	0
<i>M. malmoense</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>M. marinum</i>	1	0	0	0	0	1	1
<i>M. mucogenicum</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>M. simiae</i>	1	1	0	1	0	1	0
<i>M. szulgai</i>	2	2	0	2	0	2	0
<i>M. xenopi</i>	2	2	1	1	0	0	0
MOTT	2	1	1	1	1	0	0
<i>Mycobacteria spp.</i>	2	2	1	1	0	1	0
<i>M. gordonae</i>	11	6	3	3	2	6	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	6	2	0	1	0	6	4
Total MICO	362	289	54	271	27	250	16

#### DISPONIBILIDAD

N.º ref.	Descripción	N.º ref.	Descripción
245122	Tubos BBL MGIT indicadores de crecimiento micobacteriano de 7 mL, caja de 100 tubos.	240862	Kit de digestión/descontaminación de muestras BBL MycoPrep, diez frascos de 75 mL de solución NALC-NaOH y 5 paquetes con tampón fosfato.
245124	Kit de suplemento BACTEC MGIT 960, caja de 6 frascos, 15 mL, suplemento de crecimiento BACTEC MGIT y 6 frascos liofilizados, mezcla antibiótica BBL MGIT PANTA. Cada frasco de suplemento de crecimiento/PANTA es suficiente para 15 – 18 tubos MGIT.	240863	Kit de digestión/descontaminación de muestras BBL MycoPrep, diez frascos de 150 mL de solución NALC-NaOH y 10 paquetes con tampón fosfato.
220908	Medios inclinados BBL Lowenstein-Jensen, paquete de 10 (tubos de 20 x 148 mm con tapa).	221174	Agar BBL Middlebrook y Cohn 7H10, paquete de 20.
220909	Medios inclinados BBL Lowenstein-Jensen, caja de 100 (tubos de 20 x 148 mm con tapa).	295939	Caldo BBL Middlebrook 7H9 de 8 mL, paquete de 10 tubos.
		221818	Solución salina normal BBL de 5 mL, paquete de 10.
		221819	Solución salina normal BBL de 5 mL, caja de 100.
		231106	Tiras BBL Taxo con factor X, 1 frasco, 50 tiras.

BIBLIOGRAFIA: Ver Referencias en el texto en inglés.



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



Use by / Spøtřebuje do / Anvendes for / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použít do / Usar antes de / Använd före / Используйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Uпотřebiti do / Использовать до / дейін пайдаланура / Uпотrijebiti 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 lõppuun mennessä) / AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) / JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEEE-MM-HH / EEEEE-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 = mêsio 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 mesiacu) / 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 = sfârşitul 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) / ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) / GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalogusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Numero do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Καταλογος номер / Număr de catalog / Katalog numerasi / 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 / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuetettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autorizowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluğuna Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u 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 diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisai / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicínsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uredaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık 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 (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (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 bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu





Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
800-638-8663  
[www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds)



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

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BACTEC, BBL, Falcon, MGIT, MycoPrep, PANTA and Taxo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD