BacT/ALERT® MP

43-03064

DENOTES REVISED SECTION

Store protected from direct sunlight between 2-8°C.

See symbol glossary at end of insert.

INTENDED USE

The BacT/ALERT® MP System consists of the BacT/ALERT MP culture bottle with a removable closure used in conjunction with the MB/BacT® Antibiotic Supplement (and/or the MB/BacT Reconstitution Fluid). The BacT/ALERT MP System is designed for use with the MB/BacT or the BacT/ALERT® 3D Mycobacteria Detection Systems for recovery and detection of mycobacteria from sterile body specimens other than blood, and from digested-decontaminated clinical specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION

Tuberculosis remains a major global public health problem. The World Health Organization estimates that 9 million new cases and 2 million deaths are directly attributable to the disease each year.[1] Tuberculosis has been cited as the leading cause of death in many resource-poor and developing countries.[2] In the United States, the number of new cases reported to the CDC peaked in 1992.[2,3] Since then there has been a consistent and substantial decline in cases reported annually in the United States, largely due to the implementation of prevention and control measures during 1989 through 1993.[2] However, there is still a significant increase in the number of cases within some population groups, particularly among persons born outside the United States and its territories. Infections caused by *M. tuberculosis* complex organisms are classically pulmonary.

Mycobacteria other than the tubercle bacillus (MOTT) are referred to here as nontuberculosis mycobacteria (NTM). The majority of these isolates require incubation at 35 to 37°C except where noted. These organisms are most commonly found in soil and water and have been implicated as opportunistic pathogens in patients with underlying lung disease, immunosuppression or percutaneous trauma.[4] NTM associated with pulmonary disease are: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum*, and *M. xenopi* (optimum temperature of 42°C). *M. marinum* and *M. ulcerans*, which require incubation at 30°C, are NTM associated with cutaneous infections. NTM producing other types of infection (e.g. disseminated disease, lymphadenitis etc.) are: MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* complex (*M. chelonae* isolates may require incubation at 30°C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum*, and *M. haemophilum* (requires addition of hemin and incubation at 30°C).[2]

Mycobacteria are aerobic, nonsporeforming, nonmotile, acid-fast bacilli which have slow to very slow growth rates; generation times of species vary from 2 to >20 hr. depending upon the species.[2] Growth of *M. tuberculosis* using traditional mycobacterial media can take two to eight weeks or longer.[5] CDC recommendations suggest that a liquid culture medium be used, along with solid media, for primary culture.[6,7] The liquid-culture method is needed to provide more rapid detection, growth, and susceptibility results for *M. tuberculosis*.[7]

The MB/BacT and the BacT/ALERT 3D Mycobacteria Detection Systems, used in conjunction with the BacT/ALERT MP System, provides both a microbial detection system and a culture media with suitable nutritional and environmental conditions to recover mycobacterial species commonly isolated from patient specimens other than blood. The MB/BacT Antibiotic Supplement is intended to reduce the incidence of break-through contamination due to bacteria which may survive the decontamination/concentration process. MB/BacT Antibiotic Supplement must be added to BacT/ALERT MP bottles prior to inoculation of all non-sterile specimens. For recovery of mycobacteria present in sterile specimens, only the Reconstitution Fluid should be added to the BacT/ALERT MP bottles. MB/BacT Reconstitution Fluid contains components which are necessary to ensure optimal growth of mycobacteria present in the patient sample. Inoculated bottles are placed into the instrument where they are incubated and continuously monitored for the presence of mycobacteria that will grow in the BacT/ALERT MP culture bottle.

PRINCIPLE OF THE TEST

The MB/BacT and BacT/ALERT 3D Mycobacteria Detection Systems utilize the same principle to detect microorganisms in mycobacterial cultures as is described for the BacT/ALERT® Microbial Detection System with respect to blood cultures.[8] The MB/BacT and BacT/ALERT 3D Mycobacteria Detection Systems utilize a colorimetric sensor and reflected light to monitor the presence and production of carbon dioxide (CO_2) dissolved in the culture medium. If microorganisms are present in the test sample, carbon dioxide is produced as the organisms metabolize substrates in the culture medium. When growth of the microorganisms produces CO_2, the color of the gas-permeable sensor installed in the bottom of each culture bottle changes to lighter green or yellow. The lighter color results in an increase of reflectance units monitored by the system. Bottle reflectance is monitored and recorded by the instrument every 10 minutes. At the time of detection, approximate colony forming units (CFUs) per ml are 10^6-10^7.

REAGENTS

For *in vitro* diagnostic use.

WARNING: To reduce the risks of accidental exposure to infectious agents, additional precautions should be taken when using the BacT/ALERT MP Culture Bottle in the BacT/ALERT Microbial Detection System. It is strongly recommended that the instrument be placed in a laboratory used for the routine culture of *M. tuberculosis*. For activities involving the propagation and manipulation of *M. tuberculosis* or *Mycobacterium sp.* grown in culture, Biosafety Level 3 Practices, containment equipment, and facilities are recommended.[9]

BacT/ALERT® MP (color-coded red) – BacT/ALERT MP disposable culture bottles with a removable closure contain 10 ml of media and an internal sensor that detects carbon dioxide as an indicator of microbial growth. The BacT/ALERT MP culture bottle may be inoculated via a sterile syringe with either an attached locking needle or a sheathed needle or by removing the closure and using a needleless inoculation device.

The media formulation consists of: Middlebrook 7H9 Broth (0.47% w/v), Pancreatic Digest of Casein (0.1% w/v), Bovine Serum Albumin (1.0% w/v), Catalase (48 u/ml), in purified water. Bottles contain 10 ml of media, and are prepared with an atmosphere of CO_2, nitrogen and oxygen under vacuum. The composition of the media may be adjusted to meet specific performance requirements.

CAUTION: BacT/ALERT culture bottles contain polycarbonate. Not all disinfectants are intended for use with polycarbonate surfaces, and may cause bottle deterioration. Verify disinfectant compatibility with polycarbonate before use on BacT/ALERT culture bottle surfaces.

CAUTION: It is possible that certain rare, fastidious mycobacteria will not grow or may grow slowly in the BacT/ALERT MP culture bottle growth medium. If rare, fastidious mycobacteria requiring specialized media and culture conditions are suspected, alternative methods or extended incubation time, should be considered for recovery.

CAUTION: On rare occasions organisms may be encountered that grow in the BacT/ALERT MP culture bottle growth medium but do not produce sufficient carbon dioxide to be determined positive. For example, samples from patients undergoing treatment with antimycobacterial agents may show impaired growth.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Lyophilized supplement formulated to contain Amphotericin B (0.0180% w/v), Azlocillin (0.0034% w/v), Nalidixic Acid (0.0400% w/v), Polymyxin B (10,000 units), Trimethoprim (0.00105% w/v), Vancomycin (0.0005% w/v), and a bulking agent prior to processing. The composition of the supplement may be adjusted to meet specific performance requirements. Reconstitute with 10 ml of MB/BacT Reconstitution Fluid.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Oleic acid (0.05% w/v), Glycerol (5% w/v), Amaranth (0.004% w/v), and Bovine Serum Albumin (1% w/v) in purified water. Bottles contain a total fill volume of 15 ml each. The composition of the reconstitution fluid may be adjusted to meet specific performance requirements.

Additional materials required

MB/BacT or BacT/ALERT 3D Mycobacteria Detection System
Sterile distilled or deionized water
Middlebrook 7H11 or other mycobacterial agar or egg-base medium
Autoclave
N-Acetyl-L-Cysteine powder
Sterile 0.067 M phosphate buffer, pH 6.8
Centrifuge
CO_2 Incubator, 37°C
Sterile syringes with either attached locking needles or sheathed needles
Sterile pipettes or other sterile needleless inoculation device for bottles with removed closures
BacT/ALERT® Reseal for removable closure system
Mycobactericidal disinfectant
Alcohol swabs
Vortex mixer
Sterile 50 ml conical polypropylene centrifuge tubes
Biological safety cabinet
Sterile, disposable gloves
Disposable gowns
Disposable masks
Microscope
Materials for staining slides
Quality Control organisms

Materials available from bioMérieux

MB/BacT Mycobacteria Detection System and BacT/ALERT Microbial Detection Systems

Precautions

1. POTENTIAL INFECTIOUS TEST SPECIMEN. Observe Universal Precautions in handling and disposing of infectious materials.
2. Working with *M. tuberculosis* complex organisms grown in culture requires Biosafety Level 3 practices, containment equipment, and facilities.[9]
3. All inoculated BacT/ALERT MP culture bottles, specimen collection devices, syringes, pipettes or other needleless inoculation devices used for inoculation should be decontaminated according to your institution's procedures.[2]
4. In case of a spill or leakage, an aerosol of mycobacteria (including *M. tuberculosis*) or other bacteria may be produced. Follow the specific safety guidelines for your own institution and the CDC/NIH.[9] Phenolic disinfectants such as Amphyl® are appropriate agents for decontamination of mycobacteria and other microorganisms.
5. These culture bottles should be utilized only by trained laboratory personnel.

Storage instructions

Store BacT/ALERT MP culture bottles and MB/BacT Antibiotic Supplement Kit under refrigeration (2-8°C). Protect from direct sunlight. BacT/ALERT MP culture bottles must be allowed to equilibrate to room temperature (30-60 minutes) before use. An expiration date is printed on each bottle label. Do not use the culture bottles beyond the last day of the month indicated.

INSTRUMENTS

Review the appropriate BacT/ALERT Microbial Detection System User Manual with the MB/BacT User Manual Supplement before use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Correct specimen collection, transport, handling, and preparation are extremely important for the accurate analysis of patient cultures for mycobacterial species which may be present. Collect and process specimens according to Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] or as defined in your laboratory procedure manual. Decontamination by N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide is recommended for processing non-sterile specimens.

NOTE: bioMérieux recommends that the final pH of the inoculum sample is between 6.8 -7.2.

PROCEDURES

1. Prior to use, the BacT/ALERT MP Culture Bottles should be examined for evidence of damage or deterioration (discoloration). Bottles exhibiting evidence of damage, leakage, or deterioration should be discarded. The media should be clear, but precipitates may form at temperatures below 20°C. Do not confuse precipitation with turbidity. Do not use a bottle which contains media exhibiting turbidity, a yellow sensor, or excess gas pressure; these are signs of possible contamination.
2. Prior to use, visually inspect all MB/BacT Reconstitution Fluid vials for evidence of damage or contamination. A vial should not be used if any evidence of cracks or leakage is noted.
3. Prior to use, visually inspect all MB/BacT Antibiotic Supplement vials for cracks or degradation of the cake. A vial should not be used if cracks or degradation is noted.
4. Use needle locking syringes or syringes with attached sheathed needles when the closure is not removed for inoculation.
5. Always carry inoculated bottles in a rack or basket.

MB/BacT Antibiotic Supplement preparation

Prior to use, aseptically add 10 ml of MB/BacT Reconstitution Fluid to each vial of MB/BacT Antibiotic Supplement required for testing. Allow the cake to dissolve. Swirl gently to mix the contents.

NOTES:

- One vial of reconstituted MB/BacT Antibiotic Supplement is sufficient for 20 BacT/ALERT MP culture bottles.
- Once reconstituted, the MB/BacT Antibiotic Supplement has a shelf life of 7 days when stored at 2-8°C. The expiration date for the reconstituted supplement should be recorded on the vial label.
- Remaining Reconstitution Fluid may be stored at 2-8°C for later use with sterile specimens.

Bottle preparation and inoculation

NOTE: Take care to prevent contamination during both bottle preparation and inoculation of the patient sample.

1. Label each BacT/ALERT MP culture bottle with the appropriate patient information. The icons on the bottle label (☺,#,◷) can be defined by the user. Bottles must have equilibrated to room temperature (30-60 minutes) before inoculation.
2. Disinfect septum with an alcohol pad or equivalent. Allow the septum to dry before adding either the reconstituted Antibiotic Supplement or Reconstitution Fluid to the bottle.
3. Prior to inoculation, aseptically add 0.5 ml of reconstituted MB/BacT Antibiotic Supplement to each BacT/ALERT MP culture bottle to be used for culture of non-sterile specimens, or 0.5 ml of MB/BacT Reconstitution Fluid alone to each BacT/ALERT culture bottle to be used for culture of sterile specimens. MB/BacT Reconstitution Fluid contains components which are necessary to ensure that optimal growth of mycobacteria present in the patient samples is achieved.
   a. Aseptically transfer the reconstituted Antibiotic Supplement or Reconstitution Fluid to each BacT/ALERT MP culture bottle.
   b. A pink tint in the medium will indicate that the supplement or Reconstitution Fluid has been added successfully.

NOTE: The following steps must be performed in a biological safety cabinet while wearing appropriate protective clothing to comply with safety standards set forth by the CDC/NIH for Biosafety Level 3 guidelines.[9]

Inoculation using safety needles

1. Obtain each processed or sterile patient sample using a syringe with attached locking needle or a sheathed needle and aseptically transfer 0.5 ml into the appropriately labeled BacT/ALERT MP culture bottle. Venting is not required. Concurrent inoculation of conventional solid media is recommended. Remainder of the processed sample may be stored under refrigeration (2-8°C) for later use.
2. Swab bottle tops with gauze that has been soaked in 2% Amphyl (or another approved tuberculocidal disinfectant). Allow to dry before removing from the biological safety cabinet.
3. Ensure proper mixing of reagents and specimen in BacT/ALERT MP bottle.

Inoculation using needleless devices

NOTE: Take care to prevent contamination during both bottle preparation and inoculation of the patient sample.

1. If aseptic needleless inoculation is chosen, follow the instructions below after aseptically adding either the Antibiotic Supplement or Reconstitution Fluid to the bottle as described in this package insert.
2. Remove the metal seal by pulling on the center tab across the top down through the rim of the seal. Avoid ripping the center tab completely away from the seal. Continue to pull the tab around the bottle to remove the seal completely from the bottle.

   CAUTION: Use care when removing the metal crimp seal. If the pull-tab breaks free from the seal resulting in sharp edges, do not attempt to remove the seal by hand. Instead, the use of a hemostat or other mechanical device is recommended.
3. After removing the metal seal, remove the septum aseptically. The septum may be easier to remove if pried out of the bottle on either side of the septum slit.
4. Aseptically inoculate the specimen into the bottle via a needleless device.
5. Aseptically place the septum back into the bottle, ensuring that the septum fits fully into the opening. Place a Reseal (BacT/ALERT® Reseal) over the septum and bottle opening. The Reseal must snap over the bottle rim, and the underside of the Reseal must be in full contact with the top of the septum. The Reseal should fit tightly on the bottle.
6. Ensure proper mixing of reagents and specimen in BacT/ALERT MP bottle.

Test procedure

1. Enter inoculated BacT/ALERT MP culture bottles into the MB/BacT or BacT/ALERT 3D instrument following the instructions provided in the appropriate User Manual.
2. After culture bottles are loaded into the instrument, they should remain there for 42 days or until designated positive.
3. When the instrument indicates a positive bottle, remove the bottle according to procedures stated in the BacT/ALERT User Manual.
4. All bottles designated positive should be smeared and subcultured for acid-fast bacilli. Subculturing may be performed by removing the sample with a needle and syringe from bottles without a Reseal or from bottles with a Reseal.
   a. **Subculturing from positive bottles without a Reseal using a needle and syringe.** In a biological safety cabinet, mix bottle contents, disinfect the bottle stopper, and remove specimen for acid-fast staining and subculturing. Disinfect bottle stopper after subculture.
   b. **Subculturing from positive bottles sealed with the Reseal.** Pull the center tab away from the Reseal and remove the seal completely from the bottle. After the septum is removed aseptically, the sample may be removed. If it is desired to keep the bottle for further testing, aseptically replace the stopper and place a new Reseal over the stopper and bottle.

   If the acid-fast smear is positive, proceed with the Mycobacteria specific identification procedures employed by your institution. If the concentrated smear is negative for acid-fast bacilli, a Gram stain should be performed. If both the acid-fast smear and the Gram stain are negative, indicating a possible false positive, the bottle should be loaded back into the instrument until growth of subculture or redesignation as positive or negative. Cultures which were initially determined false positive and were redesignated positive, should be smeared and subcultured.
5. If non-mycobacterial organisms are seen on the Gram stain, reprocess entire bottle contents through another decontamination procedure and inoculate into a new BacT/ALERT MP culture bottle, or discard and obtain another specimen for culture. If the new BacT/ALERT MP culture bottle again grows non-mycobacterial organisms, discard and obtain a new specimen for culture.
6. Signal negative cultures at the maximum test time should be visually examined for turbidity. If contents of the bottle are turbid, aseptically obtain a sample for acid-fast staining and subculture according to your laboratory's protocol. Bottles not exhibiting turbidity may be discarded. Decontaminate all bottles prior to disposal.
7. Procedures for loading and unloading culture bottles into the MB/BacT or BacT/ALERT 3D instrument are given in the User Manual.
8. **Do not reuse BacT/ALERT culture bottles.** Dispose of inoculated BacT/ALERT culture bottles according to your laboratory protocol. Autoclaving and/or incinerating inoculated BacT/ALERT bottles is appropriate.[9]

RESULTS

Positive or negative culture bottles are determined by decision-making software contained in the MB/BacT or BacT/ALERT 3D Mycobacteria Detection Systems. No action is required until the instrument signals positive or negative culture bottles.

Reporting results

Results	Report
Signal +/AFB Smear +	AFB positive; identification pending
Signal +/AFB Smear –	No report; or specimen contaminated with non-mycobacterial organisms; unable to determine presence/ absence of AFB

Report preliminary results only after an acid-fast stain has been performed.

QUALITY CONTROL

A Certificate of Conformance is provided with each case of BacT/ALERT MP culture bottles indicating satisfactory growth performance of *M. tuberculosis* ATCC 25177 and *M. intracellulare* ATCC 13950. Upon receipt, new lots or shipments of BacT/ALERT MP culture bottles or reagents may be tested for quality control. Refer to CLSI/NCCLS M22-A3 for appropriate Quality Control organisms. Follow the Bottle preparation and inoculation procedure:

1. Add 0.5 ml of rehydrated MB/BacT Antibiotic Supplement to each BacT/ALERT MP culture bottle required for testing.
2. Inoculate representative bottles with 0.5 ml of the control organisms, diluted to 10^4 CFU/ml in sterile, physiological saline or sterile, unsupplemented Middlebrook 7H9 Broth (approved lot).
3. After obtaining anticipated results, use remaining bottles for testing clinical specimens. If expected results are not obtained, contact bioMérieux Customer Service.

Instrument
A BacT/ALERT Reflectance Standard kit is provided with each instrument for the QC and Calibration procedures. All quality control should be part of normal system maintenance. Refer to the BacT/ALERT User Manual for more information.

LIMITATIONS OF THE TEST

Many variables involved in mycobacterial testing cannot be practically controlled to provide total confidence that results obtained are due solely to proper or improper performance of any culture medium or detection system.

1. Cultures obtained for primary diagnosis after initiation of antimicrobial therapy may produce negative results.
2. Recovery of mycobacteria in the BacT/ALERT MP bottles is dependent on the quality of the specimen collected, the numbers of culturable organisms in the specimen volume, and the method of processing. Adherence to procedural instructions is critical for optimum recovery of mycobacteria.
3. Organisms are often few in numbers. Collection of specimens over three consecutive days is generally recommended.
4. Improper processing/decontamination or delays in transport of specimens can result in an overgrowth of bacteria which could lead to a contaminated broth culture. The entire culture medium can become contaminated if even one viable bacterium is present in the specimen after processing.
5. Contaminants resistant to the antibiotics contained in the MB/BacT Antibiotic Supplement may be encountered.
6. Colony morphology and pigmentation should only be determined on solid media.
7. BacT/ALERT MP culture bottles with a positive signal may contain one or more species of mycobacteria and/or other non-mycobacterial species. In mixed mycobacteria cultures in broth, a slow grower may be out-competed by a fast grower or the culture discarded early after the rapid grower is detected. Identification of mycobacteria present requires subculture and additional procedures to identify organisms present. The consistency of microscopic morphology in BacT/ALERT MP culture bottles has not been established.
8. Contamination with saprophytic mycobacteria in tap water or other laboratory reagents and equipment may cause "clinically" false positive results (recovery of mycobacteria not in the clinical specimen).
9. Decontamination by the N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide method is recommended. Other decontamination methods have not been tested in conjunction with BacT/ALERT MP culture medium. Digestant-decontaminant reagents may have harmful effects on mycobacteria.
10. Mycobacteria may vary in acid-fastness depending on strain, age of culture, and other variables. All bottles with a positive BacT/ALERT MP signal or appearing turbid should be subcultured to both mycobacterial selective and nonselective media. Non-mycobacterial species may overgrow mycobacteria present. Such culture bottles should be decontaminated and recultured.
11. BacT/ALERT MP culture bottles are incubated at 35°C precluding the recovery of mycobacteria requiring other incubation temperatures (e.g., *M. marinum, M. ulcerans*, and *M. haemophilum*). Recovery of such organisms requires additional culture methods. Organisms with special growth requirements (e.g., *M. haemophilum*) may not be recovered in BacT/ALERT MP bottles when incubated at the appropriate temperature. The following isolates have been recovered in analytical studies: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae*, and *M. xenopi*. The ability of the BacT/ALERT MP bottles to recover other uncommon isolates is unknown.
12. Ground tissue samples are difficult to inoculate into BacT/ALERT MP culture bottles with safety needles and syringes. In order to ensure adequate inoculation, tissue specimens must be ground finely enough to permit adequate inoculation of the material into the BacT/ALERT MP bottles. In addition, it may be advantageous to use larger gauge safety needles, or remove the removable closure, aseptically add the ground specimen and apply a Reseal to the BacT/ALERT MP culture bottle. If contamination of ground tissue samples is suspected, decontaminate and process prior to adding to BacT/ALERT MP bottles. This will allow maximum recovery of mycobacteria that may be present.
13. Prolonged incubation or the addition of Mycobactin J may be required when *M. malmoense* or *M. genavense* is suspected. *M. malmoense* and *M. genavense* are known to require extended incubation past the normal schedules employed by many U.S. laboratories.[2]
14. The Antibiotic Supplement, although necessary for the testing of most specimens, may inhibit the growth of some mycobacteria.
15. False negative rates from bioMérieux's clinical evaluation were 0.2 %.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE TEST

Seeded studies were performed using the following organisms at levels of ≤ 10^6 CFU/bottle and ≤ 10^2 CFU/bottle.

Microorganism	Inoculum (CFU/bottle)	Time to Detection (days)[1] BacT/ALERT MP (Plastic)
TB Complex		
M. tuberculosis (4 strains)	≤ 10^6	5.6 – 10.3
	≤ 10^2	13.7 – 18.8
M. bovis (2 strains)	≤ 10^6	7.1 – 7.8
	≤ 10^2	14.4 – 17.4
Photochromogens (Runyoun I)		
M. kansasii (2 strains)	≤ 10^6	7.4 – 8.8
	≤ 10^2	13.1 – 15.0
M. simiae	≤ 10^6	4.1
	≤ 10^2	8.9
Scotochromogens (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14.1
	≤ 10^2	23.7
M. xenopi (2 strains)	≤ 10^6	10.3 – 13.8
	≤ 10^2	19.9 – 25.9[2]
M. scrofulaceum (2 strains)	≤ 10^6	12.6 – 23.3
	≤ 10^2	20.7 – NG[3]
Nonchromogens (Runyoun III)		
M. avium (4 strains)	≤ 10^6	4.2 – 6.8
	≤ 10^2	10.2 – 15.9
M. intracellulare (4 strains)	≤ 10^6	5.6 – 7.1
	≤ 10^2	10.8 – 16.2
M. malmoense	≤ 10^6	15.4
	≤ 10^2	21.9
Rapid Growers (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2.2
	≤ 10^2	4.1
M. fortuitum (2 strains)	≤ 10^6	3.5 – 4.1
	≤ 10^2	3.9 – 8.9

[1] Each organism was tested with MB/BacT Antibiotic Supplement. Testing was performed for single bottles at ≤ 10^6 and in triplicate at ≤ 10^2. Data listed represent a range of values from multiple strains, except for *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense*, and *M. chelonae* where data for individual organism is given.
[2] One of three bottles showed no growth after 42 days; value given is average of two bottles.
[3] One organism tested showed no growth for three of three bottles after 42 days.

REFERENCES

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

AVAILABILITY

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/case	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 tests/kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 vials/kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 vials/kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 units/box	REF 259787

For technical assistance in the U.S.A., contact bioMérieux Customer Service at 1-800-682-2666. Outside the U.S.A., contact your local bioMérieux Representative.

bioMérieux, the blue logo, and BacT/ALERT are used, pending, and/or registered trademarks belonging to bioMérieux SA or one of its subsidiaries.

Amphyl is a registered trademark of the Linden Corporation.

ATCC is a registered trademark of American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

CE

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

July 2008

BacT/ALERT® MP

DANSK

43-03064

ANGIVER ÆNDRET AFSNIT

Opbevares ved 2-8 °C, beskyttet mod direkte sollys.

Se symboloversigten sidst på indlægssedlen.

TILSIGTET BRUG

BacT/ALERT® MP-systemet består af BacT/ALERT MP dyrkningsflasken med aftageligt låg og anvendes sammen med det MB/BacT® Antibiotic Supplement (og/eller MB/BacT Reconstitution Fluid). BacT/ALERT MP systemet er udformet til anvendelse med MB/BacT eller BacT/ALERT® 3D systemer til detektion af mycobakterier til genfinding og detektion af mycobakterier fra sterile legemsprøver, bortset fra blod, og fra fordøjede-dekontaminerede kliniske prøver.

OVERSIGT OG FORKLARING

Tuberkulose er stadigt et stort globalt og alment sundhedsproblem. FN's Verdenssundhedsorganisation vurderer, at 9 millioner nye tilfælde og 2 millioner dødsfald direkte kan tilskrives sygdommen hvert år.[1] Tuberkulose er blevet anført som den førende dødsårsag i mange ressourcefattige udviklingslande.[2] I USA nåede antallet af nye rapporterede tilfælde til CDC sit højdepunkt i 1992.[2,3] Siden da er der sket et stød og betydeligt fald i antallet af årligt rapporterede tilfælde i USA, hovedsageligt på grund af implementeringen af bekæmpelses- og kontrolforholdsregler fra 1989 til 1993.[2] Der ses dog stadig en betydelig stigning i antallet af tilfælde inden for visse befolkningsgrupper, især blandt personer født uden for USA og dets territorie. Infektioner forårsaget af komplekse *M. tuberculosis* organismer er klassisk pulmonale.

Mycobakterier, undtagen tuberkelbacillus (MOTT), omtales her som ikke-tuberkulose mycobakterier (NTM). Hovedparten af disse isolater kræver inkubation ved 35 til 37 °C, hvis intet andet er angivet. Disse organismer findes sædvanligvis i jord og vand, og har været impliceret som opportunistiske patogener i patienter med underliggende lungesygdom, immunsuppression eller perkutant traume.[4] NTM associeret med pulmonær sygdom er: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum*, og *M. xenopi* (optimal temperatur på 42 °C). *M. marinum* og *M. ulcerans* er NTM'er associeret med kutane infektioner og kræver inkubation ved 30 °C . NTM'er som producerer andre slags infektioner (f.eks. dissemineret sygdom, adenolymfocyt osv.) er: MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* kompleks (*M. chelonae*-isolater kræver muligvis inkubation ved 30 °C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* og *M. haemophilum* (kræver tilsætning af hemin og inkubation ved 30 °C).[2]

Mycobakterier er aerobe, ikke-sporedannende, ikke-bevægelige, syrefaste bakterier, hvis vækstrate er langsom eller meget langsom. Arters dyrkningstid varierer fra 2 til >20 timer afhængig af arten.[2] Dyrkning af *M. tuberculosis* med traditionelle mycobakterielle medier kan tage 2 til 8 uger eller længere.[5] CDC-anbefalinger foreslår, at et flydende medie, sammen med et fast medie, anvendes til primær dyrkning.[6,7] Det flydende dyrkningsmedie er nødvendigt for at give hurtigere detektion, vækst og følsomhedsresultater overfor *M. tuberculosis*.[7]

MB/BacT og BacT/ALERT 3D systemerne til detektion af mycobakterier anvendt sammen med BacT/ALERT MP systemet leverer både et mikrobielt detektionssystem og et dyrkningsmedium med passende nærings- og miljømæssige betingelser for at genfinde mycobakterielle arter, som sædvanligvis er isolerede fra andre patientprøver end blod. MB/BacT antibiotisk supplement er beregnet til at reducere forekomsten af gennembrudskontaminering, som følge af bakterier der muligvis overlever dekontaminerings/koncentrationsprocessen. MB/BacT Antibiotic Supplement (antibiotisk supplement) skal tilsættes BacT/ALERT MP flasker før inokulation af alle ikke-sterile prøver. Der skal kun tilsættes rekonstitueringsvæske til BacT/ALERT MP flasker for at genfinde mycobakterier, som er til stede i sterile prøver. MB/BacT Reconstitution Fluid indeholder komponenter, som er nødvendige for at sikre optimal vækst for mycobakterier, som er til stede i patientprøverne. Inokulerede flasker placeres i instrumentet, hvor de inkuberes og kontinuerligt overvåges for tilstedeværelsen af mycobakterier, som vokser i BacT/ALERT MP dyrkningsflasken.

TESTPRINCIP

Med hensyn til bloddyrkninger anvender MB/BacT og BacT/ALERT 3D systemerne til detektion af mycobakterier det samme princip til detektion af mikroorganismer i mycobakterielle dyrkninger, som princippet beskrevet for BacT/ALERT® systemet til mikrobiel detektion.[8] MB/BacT og BacT/ALERT 3D systemerne til detektion af mycobakterier anvender en kolorimetrisk sensor og reflekteret lys til at overvåge tilstedeværelsen og produktionen af kuldioxid (CO_2), der opløst i dyrkningsmediet. Hvis der er mikroorganismer til stede i prøven, produceres der kuldioxid, når organismerne metaboliserer substrater i dyrkningsmediet. Når mikroorganismernes vækst producerer CO_2, skifter den gas-permeable sensor, der er installeret i bunden af hver dyrkningsflaske, farve til en lysere grøn eller gul farve. Den lysere farve resulterer i en stigning i reflektansenheder, som overvåges af systemet. Flaskereflektans overvåges og noteres af instrumentet hvert tiende minut. På detektionstidspunktet er kolonidannende enheder (CFU) pr. ml ca. 10^6-10^7.

REAGENSER

Til *in vitro* diagnostisk brug.

ADVARSEL: For at nedsætte risikoen for eksponering overfor infektiøse stoffer ved et uheld, bør der imidlertid tages yderligere forholdsregler, når BacT/ALERT MP-dyrkningsflasken anvendes i BacT/ALERT Microbial Detection System. Det anbefales kraftigt, at instrumentet anbringes i et laboratorium, der anvendes til rutinedyrkning af *M. tuberculosis*. For aktiviteter, der omfatter formering og manipulation af *M. tuberculosis* eller *Mycobacterium*-arter, der volver yderligere forholdsregler, anbefales niveau 3 praksis for biosikkerhed, udstyr og faciliteter for inddæmning.[9]

BacT/ALERT® MP (farvekodet rød) – BacT/ALERT MP dyrkningsflasker til engangsbrug med aftageligt låg indeholder 10 ml medium samt en intern sensor, som detekterer kuldioxid som en indikator for mikrobiel vækst. BacT/ALERT MP dyrkningsflasken kan inokuleres vha. en steril sprøjte, med enten en påsat sikringskanyle eller en overtrukket kanyle, eller ved at fjerne låget og anvende et inokulationsinstrument uden kanyle.

Dyrkningsmediet består af: Middlebrook 7H9 bouillon (0,47 % w/v), pancreasfordøjet kasein (0,1 % w/v), serumalbumin fra kvæg (1,0 % w/v), katalase (48 u/ml) i renset vand. Flaskerne indeholder 10 ml medium og en atmosfære af CO_2, nitrogen og oxygen under vakuum. Mediernes sammensætning kan justeres for at imødekomme specifikke krav til præstation.

FORSIGTIG: BacT/ALERT-dyrkningsflasker indeholder polycarbonat. Ikke alle desinfektionsmidler er tilsigtet brug på polycarbonatflader og kan beskadige flasken. Kontroller, om midlet kan anvendes på polycarbonat, før det anvendes på BacT/ALERT-dyrkningsflaskernes overflader.

FORSIGTIG: Det kan ske, at visse sjældne, kræsne mycobakterier ikke vil vokse eller kun vil vokse langsomt i BacT/ALERT MP dyrkningsflaskemediet. Hvis der er mistanke om tilstedeværelse af sjældne, kræsne mycobakterier, som kræver specielle medier eller dyrkningsbetingelser, skal der overvejes anvendelse af alternative metoder eller forlænget inkubationstid til genfinding.

FORSIGTIG: Ved sjældne lejligheder findes organismer, som vokser i BacT/ALERT MP dyrkningsflaskemediet, men som ikke afgiver tilstrækkeligt kuldioxid til at kunne bestemmes som positiv. Prøver fra patienter, som gennemgår behandling med mycobakteriedræbende midler, kan f.eks udvise svækket vækst.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Lyofiliseret supplement formuleret til at indeholdende amfotericin B (0,0180 % w/v), azlocillin (0,0034 % w/v), nalidixinsyre (0,0400 % w/v), polymyxin B (10.000 enheder), trimethoprim (0,00105 % w/v), vancomycin (0,0005 % w/v), samt et volumenforøgende middel. Supplementes sammensætning kan justeres for at imødekomme specifikke krav til præstation. Rekonstituér med 10 ml MB/BacT Reconstitution Fluid (rekonstitueringsvæske).

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Oleinsyre (0,05 % w/v), glycerol (5 % w/v), amarant (0,004 % w/v) og serumalbumin fra kvæg (1 % w/v) i renset vand. Flaskerne har hver en total fyldningsvolumen på 15 ml. Rekonstitueringsvæskens sammensætning kan justeres for at imødekomme specifikke krav til præstation.

Andre nødvendige materialer

MB/BacT eller BacT/ALERT 3D system til detektion af mycobakterier
Sterilt, destilleret eller deioniseret vand
Middlebrook 7H11 eller anden mycobakteriel agar eller æggebaseret medium
Autoklave
N-acetyl-L-cystein pulver
Steril 0,067 M fosfatbuffer, pH 6,8
Centrifuge
CO_2 inkubator, 37 °C
Sterile sprøjter med enten påsatte sikringskanyler eller overtrukne kanyler
Sterile pipetter eller andet sterilt inokulationsinstrument uden kanyle til flasker med aftagelige låg.
BacT/ALERT® system til genforsegling af aftageligt låg
Mycobakterie dræbende desinfektionsmiddel
Spritservietter
Vortexmixer
Sterile 50 ml koniske polypropylen centrifugeringsglas
Biologisk sikkerhedskabinet
Sterile engangshandsker
Engangskitler
Engangsmasker
Mikroskop
Materialer til farvning af præparatglas
Kvalitetskontrol organismer

Materialer, der fås fra bioMérieux

MB/BacT-systemet til detektion af mikrobakterier og BacT/ALERT mikrobielt detektionssystem

Forholdsregler

1. POTENTIEL SMITTEFARLIG TESTPRØVE. Iagttag almindelige forholdsregler ved håndtering og bortskaffelse af smittefarlige materialer.
2. Arbejdet med komplekse *M. tuberculosis*-organismer, udviklet ved dyrkning, kræver biosikkerhedsniveau 3 praksis, inddæmningsudstyr og faciliteter.[9]
3. Alle inokulerede BacT/ALERT MP dyrkningsflasker, prøvetagningsinstrumenter, sprøjter, pipetter eller andre inokuleringsinstrumenter uden kanyle, som anvendes til inokulering, skal dekontamineres i henhold til institutionens procedurer.[2]
4. I tilfælde af spild eller lækage, kan der dannes aerosol af mycobakterier (herunder *M. tuberculosis*) eller andre bakterier. Følg institutionens sikkerhedsretningslinjer og CDC/NIH.[9] Fenolholdige desinfektionsmidler, såsom Amphyl®, er egnede midler til dekontaminering af mycobakterier og andre mikroorganismer.
5. Disse dyrkningsflasker må kun anvendes af uddannet laboratoriepersonale.

Opbevaring

Opbevar BacT/ALERT MP dyrkningsflasker og MB/BacT Antibiotic Supplement nedkølet (2-8 °C). Beskyt mod direkte sollys. BacT/ALERT MP dyrkningsflasker skal, inden brug, have tid til at antage stuetemperatur (30-60 minutter). En udløbsdato er påtrykt hver flaskeetiket. Dyrkningsflaskerne bør ikke anvendes efter den sidste dag i den angivne måned.

INSTRUMENTER

Læs inden anvendelse den behørige brugerhåndbog til BacT/ALERT mikrobielt detektionssystem, samt tillægget til MB/BacT brugerhåndbogen.

PRØVEINDSAMLING OG FORBEREDELSE

Korrekt prøvetagning, transport, håndtering og forberedelse af prøver er ekstremt vigtigt for den nøjagtige analyse af patientdyrkninger for tilstedeværelsen af eventuelle mycobakterielle arter. Blodprøverne skal tages og bearbejdes ifølge håndbogen for klinisk mikrobiologiprocedure[10] eller som defineret i dit laboratoriets procedurehåndbog. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid anbefales til bearbejdning af ikke-sterile prøver.

BEMÆRK: bioMérieux anbefaler, at den endelige pH-værdi for inokulumprøven er 6,8 -7,2.

PROCEDURER

1. Inden anvendelse skal BacT/ALERT MP-dyrkningsflasker undersøges for tegn på beskadigelse eller forringelse (misfarvning). Flasker, som udviser tegn på beskadigelse, lækage eller forringelse, skal kasseres. Mediet skal være klart, dog kan bundfældninger dannes ved temperaturer under 20 °C. Undgå at forveksle bundfald med uklarhed. Undlad at benytte flasker, som er uklare, har for kraftigt gastryk, eller hvis sensor er gul, da dette er tegn på mulig kontaminering.
2. Inspicér visuelt alle MB/BacT Reconstitution Fluid hætteglas med rekonstitueringsvæske inden anvendelse for tegn på beskadigelse eller kontaminering. Hvis der noteres tegn på lækage eller revner, må et hætteglas ikke anvendes.
3. Inspicér visuelt alle MB/BacT Antibiotic Supplement hætteglas med antibiotisk supplement inden anvendelse for tegn på nedbrydning af indholdet. Hvis der ses tegn på revner eller nedbrydning, må hættelglasset ikke anvendes.
4. Anvend sprøjter med sikringskanyle eller sprøjter med påsatte overtrukne kanyler, med mindre låget er fjernet med henblik på inokulation.
5. Inokulerede flasker skal altid bæres i et stativ eller en kurv.

Præparation af MB/BacT antibiotisk supplement

Tilsæt aseptisk 10 ml MB/BacT Reconstitution Fluid til hvert hætteglas med MB/BacT Antibiotic Supplement, som kræves til testning inden anvendelse. Lad indholdet opløses. Snur forsigtigt glasset rundt for at blande indholdet.

BEMÆRKNINGER:
- Ét hætteglas med rekonstitueret MB/BacT Antibiotic Supplement er nok til 20 BacT/ALERT MP dyrkningsflasker.
- Det rekonstituerede MB/BacT Antibiotic Supplement har en levetid på 7 dage under opbevaring ved 2-8 °C. Udløbsdatoen for det rekonstituerede supplement skal noteres på hætteglassets etiket.
- Tiloversbleven rekonstituteringsvæske kan opbevares ved 2-8 °C med henblik på senere anvendelse med sterile prøver.

Flaskeforberedelse og inokulation

BEMÆRK: Sørg for at undgå kontaminering under flaskeforberedelse og inokulation af patientprøven.

1. Sørg for, at hver BacT/ALERT MP dyrkningsflaske er mærket med den relevante patientinformation. Ikonerne på flaskeetiketten (☺,#,☹) kan defineres af brugeren. Flasker skal være udlignet til stuetemperatur (30-60 minutter) før inokulation.
2. Desinficér septum med en spritserviet eller lignende. Lad septum tørre, før flasken tilsættes enten det rekonstituerede antibiotiske supplement eller rekonstitueringsvæsken.
3. Inden inokulation tilsættes 0,5 ml rekonstitueret MB/BacT Antibiotic Supplement aseptisk til hver BacT/ALERT MP dyrkningsflaske, som skal anvendes til dyrkning af ikke-sterile prøver, eller 0,5 ml MB/BacT Reconstitution Fluid alene til hver BacT/ALERT dyrkningsflaske, som skal anvendes til dyrkning af sterile prøver. MB/BacT Reconstitution Fluidindeholder ingredienser, som er nødvendige for at sikre opnåelse af optimal vækst for mycobakterier til stede i patientprøverne.
   a. Overfør aseptisk det rekonstituerede antibiotiske supplement eller rekonstitueringsvæsken til hver BacT/ALERT MP dyrkningsflaske.
   b. En pink farvetone i mediet angiver, at supplementet eller rekonstitueringsvæsken er blevet korrekt tilsat.

BEMÆRK: Følgende trin skal udføres i et biologisk sikkerhedskabinet, iført passende beskyttende beklædning, for at være i overensstemmelse med sikkerhedsstandarderne fastlagt af CDC/NIH for niveau 3 biosikkerhedsretningslinier.[9]

Inokulation med sikkerhedskanyle

1. Opsug hver bearbejdet eller steril patientprøve med en sprøjte med påsat sikringskanyle, eller en overtrukket kanyle, og overfør 0,5 ml aseptisk til den behørigt mærkede BacT/ALERT MP dyrkningsflaske. Der kræves ikke udluftning. Samtidig inokulation med almindeligt, fast medie anbefales. Resten af den behandlede prøve kan opbevares nedkølet (2-8 °C) til senere brug.
2. Tør flasketoppene af med gaze, som er gennemvædet med 2 % Amphyl (eller andet godkendt mycobakterie dræbende desinfektionsmiddel). Lad tørre inden fjernelse fra det biologiske sikkerhedskabinet.
3. Sørg for korrekt blanding af reagenser og prøve i BacT/ALERT MP-flasken.

Inokulation med instrumenter uden kanyler

Bemærk: Sørg for at undgå kontaminering under flaskeforberedelse og inokulation af patientprøven.

1. Hvis aseptisk inokulation uden kanyle vælges, skal nedenstående vejledninger følges efter aseptisk tilsættelse af enten det antibiotiske supplement eller rekonstituerings væsken til flasken, som beskrevet i denne indlægssseddel.
2. Fjern metalforseglingen ved at trække midterfligen henover toppen og ned gennem kanten af forseglingen. Undgå at rive midterfligen helt væk fra forseglingen. Forsæt med at trække fligen rundt om flasken for at fjerne forseglingen fuldstændigt fra flasken.

   FORSIGTIG: Vis omhu ved fjernelse af metalkrympningsforseglingen. Hvis trækkefligen brækker af forseglingen, resulterende i skarpe kanter, skal det undgås at bruge fingerne til at fjerne forseglingen. Det anbefales istedet at bruge en klemme eller anden mekanisk anordning.
3. Fjern septum aseptisk, efter at metalforseglingen er blevet fjernet. Septum kan være lettere at fjerne, hvis det lirkes ud af flasken fra hver side af septumslidsen.
4. Inokulér aseptisk prøven i flasken med et instrument uden kanyle.
5. Sæt septum tilbage i flasken på aseptisk vis, idet det sikres, at septum passer helt tæt i åbningen. Anbring en forsegling (BacT/ALERT® Reseal) over septum og flaskeåbning. Forseglingen skal klikke fast over flaskekanten, og forseglingens underside skal være i fuld kontakt med toppen af septum. Forseglingen skal passe stramt på flasken.
6. Sørg for korrekt blanding af reagenser og prøve i BacT/ALERT MP-flasken.

Testprocedure

1. Indsæt inokulerede BacT/ALERT MP dyrkningsflasker i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D instrumentet, som angivet i vejledningerne i den tilhørende brugerhåndbog.
2. Efter at dyrkningsflaskerne er indsat i instrumentet, skal de forblive dér i 42 dage, eller indtil de bliver bestemt positive.
3. Når instrumentet angiver en positiv flaske, fjernes flasken ifølge procedurerne beskrevet i BacT/ALERT brugerhåndbogen.
4. Alle flasker, der bliver bestemt positive, skal udstryges og kontroludsås for syrefaste bakterier. Kontroludsåning kan udføres ved at udtage prøvemateriale ved hjælp af en sprøjte med kanyle fra flasker med eller uden forsegling.
   a. **Kontroludsåning fra positive flasker, uden genforsegling, med en sprøjte med kanyle.** Under anvendelse af et biologisk sikkerhedskabinet, blandes flaskeindholdet, flaskeproppen desinficeres, og prøvemateriale udtages med henblik på syrefast farvning og kontroludsåning. Desinficér flaskeproppen efter kontroludsåning.
   b. **Kontroludsåning fra positive flasker forseglet med genforseglingen.** Træk midterfligen væk fra forseglingen, og fjern forseglingen fuldstændigt fra flasken. Prøvemateriale kan udtages, efter at septum er blevet aseptisk fjernet. Prøven kan, om ønsket, gemmes til yderligere testning ved aseptisk at genindsætte proppen og lægge en ny forsegling over proppen og flasken.

   Hvis den syrefaste udstrygning er positiv, fortsættes med de specifikke identifikationsprocedurer for mycobakterier, som anvendes af din institution. Hvis den koncentrerede udstrygning er negativ for syrefaste bakterier, skal en gram-farvning foretages. Hvis både den syrefaste udstrygning og gram-farvningen er negative, og dermed indikerer et mulig falsk positivt resultat, skal flasken sættes ind i systemet igen, indtil vækst ses på udsåningen eller flasken igen bestemmes positiv eller negativ. Dyrkninger, som oprindeligt blev bestemt som falskt positive, og derefter igen blev bestemt positive skal udstryges og kontroludsås.
5. Hvis ikke-mycobakterielle organismer ses i gram-farvingen, skal hele flaskens indhold gennemgå en ny dekontaminerings procedure, og inokuleres i en ny BacT/ALERT MP dyrkningsflaske, eller bortkast og indhent en anden prøve til dyrkning. Hvis der igen vokser ikke-mycobakterielle organismer i den nye BacT/ALERT MP-dyrkningsflaske, skal den kasseres, og der skal udtages en ny prøve til dyrkning.
6. Tilkendegivelser af negative dyrkninger skal, ved den maksimale testtid, undersøges visuelt for uklarhed. Hvis flaskens indhold er uklart, udtages prøvemateriale med aseptisk teknik med henblik på syrefast farvning og kontroludsåning i henhold til dit laboratoriets protokol. Flasker, som udviser klarhed, kan bortkastes. Dekontaminér alle flasker før bortskaffelse.
7. Brugerhåndbogen indeholder procedurer for indsætning og udtagning af flasker i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D instrumentet.
8. **BacT/ALERT-dyrkningsflasker må ikke genbruges.** Inokulerede BacT/ALERT-dyrkningsflasker skal bortskaffes i henhold til laboratoriets protokol. Det er relevant at autoklavere og/eller forbrænde inokulerede BacT/ALERT-flasker.[9]

RESULTATER

Softwaren, som leveres med MB/BacT eller BacT/ALERT 3D systemerne til detektion af mycobakterier, bestemmer om dyrkningsflaskerne er positive eller negative. Der kræves ingen handling, indtil instrumentet tilkendegiver positive eller negative dyrkningsflasker.

Rapportresultater

Resultater	Rapport
Signal +/AFB udstrygning +	AFB positiv; identifikation afventes
Signal +/AFB udstrygning –	Ingen rapport; eller prøven kontamineret med ikke-mycobakterielle organismer; ude af stand til at bestemme tilstedeværelse/fravær af AFB

Foreløbige resultater må ikke rapporteres, inden der er udført en syrefast farvning.

KVALITETSKONTROL

Et 'Certificate of Conformance' (overensstemmelsescertifikat), som angiver at vækstpræstationen er tilfredsstillende for *M. tuberculosis* ATCC 25177 og *M. intracellulare* 13950, er vedlagt hver kasse BacT/ALERT MP dyrkningsflasker. Nye partier eller leveringer af BacT/ALERT MP-dyrkningsflasker eller -reagenser kan kvalitetskontrolleres efter modtagelsen. Se CLSI/NCCLS M22-A3 for oplysninger om relevante kvalitetskontrolorganismer. Følg proceduren for flaskeforberedelse og inokulation:

1. Tilsæt 0,5 ml rehydreret MB/BacT Antibiotic Supplement til hver BacT/ALERT MP dyrkningsflaske som kræves til testning.
2. Inokulér repræsentative flasker med 0,5 ml af kontrolorganismer fortyndet til 10^4 CFU/ml i sterilt, fysiologisk saltvand eller steril, Middlebrook 7H9 bouillon uden supplement (godkendt lotnummer).
3. Efter opnåelse af forventede resultater kan de resterende flasker anvendes til testning af kliniske prøver. Hvis forventede resultater ikke opnås, kontakt bioMérieux kundeservice.

Instrument

Et BacT/ALERT reflektansstandardsæt leveres med hvert instrument til kvalitets- og kalibreringsprocedurerne. Al kvalitetskontrol bør udgøre en del af almindelig systemvedligeholdelse. Der henvises til brugerhåndbogen til BacT/ALERT.

TESTBEGRÆNSNINGER

Mange variabler, der er involverede i mycobakteriel testning, kan ikke praktisk kontrolleres, så der kan opnås fuld tillid til, at de opnåede resultater udelukkende er opstået pga. korrekt eller ukorrekt funktion af ét af dyrkningsmedierne eller detektionssystemet.

1. Efter påbegyndelsen af antimikrobiel behandling kan dyrkninger, som er indhentet med henblik på primær diagnose, give negative resultater.
2. Genfinding af mycobakterier i BacT/ALERT MP flaskerne er afhængig af kvaliteten af den indhentede prøve, antallet af dyrkbare organismer i prøvevolumen og bearbejdningsmetoden. Overholdelse af procedueremæssige vejledninger er afgørende for optimal genfinding af mycobakterier.
3. Antallet af organismer er ofte lavt. Det anbefales generelt at tage prøver over tre sammenhængende dage.
4. Forkert bearbejdning/dekontamination, eller forsinkelser i transporten af prøver, kan resultere i en for stærk bakterievækst, hvilket kan føre til en kontamineret dyrkningsbouillon. Hele dyrkningsmediet kan blive kontamineret, hvis bare én levedygtig bakterie er til stede i prøven efter bearbejdning.
5. Kontaminater, der er modstandsdygtige overfor antibiotika indeholdt i MB/BacT Antibiotic Supplement, kan forekomme.
6. Kolonimorfologi og pigmentering må ikke kun bestemmes på fast medie.
7. BacT/ALERT MP-dyrkningsflasker, som er blevet tilkendegivet som positiv, kan indeholde én eller flere mycobakterier og/eller ikke-mycobakterielle arter. I blandede dyrkninger med mycobakterier i bouillon kan en langsomt voksende bakterie blive udkonkurreret af en hurtigt voksende bakterie, eller dyrkningen kan blive bortkastet før tid, efter at den hurtigt voksende bakterie er blevet detekteret. Identifikation af tilstedeværende mycobakterier kræver udsåning og yderligere procedurer for at identificere tilstedeværende organismer. Pålideligheden af mikroskopisk morfologi i BacT/ALERT MP dyrkningsflasker er ikke blevet fastslået.
8. Kontaminering med saprofytære mycobakterier fra postevand eller andre laboratoriereagenser og udstyr kan give "klinisk" falske positive resultater (genfinding af mycobakterier, som ikke forefindes i den kliniske prøve).
9. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid anbefales. Andre dekontamineringsmetoder er ikke blevet testet sammen med BacT/ALERT MP dyrkningsmedium. Fordøjende dekontamineringsreagenser kan skade mycobakterier.
10. Mycobakterier kan varierer i syrefasthed afhængig af stamme, dyrkningens alder og andre variabler. Alle flasker, som er blevet tilkendegivet som positive af BacT/ALERT MP systemet, eller som ser uklare ud, skal udsås på både mycobakterielt selektive og ikke-selektive medier. Ikke-mycobakterielle arter kan vokse for stærkt i forhold til tilstedeværende mycobakterier. Sådanne dyrkningsflasker skal dekontamineres og gendyrkes.
11. BacT/ALERT MP dyrkningsflasker inkuberes ved 35 °C, hvilket udelukker genfinding af mycobakterier, som kræver andre inkubationstemperaturer (f.eks. *M. marinum, M. ulcerans*, *M. haemophilum*). Genfinding af sådanne organismer kræver yderligere dyrkningsmetoder. Organismer med specielle krav til vækst (f.eks. *M. haemophilum*), kan muligvis ikke genfindes i BacT/ALERT MP flasker, selvom de inkuberes ved den rette temperatur. Følgende isolater er blevet genfundet i analyserende undersøgelser: *M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. chelonae, M. fortuitum, M. kansasii, M. xenopi, M. bovis, M. gordonae og M. simiae.* BacT/ALERT MP flaskernes evne til at genfinde andre usædvanlige isolater kendes ikke.
12. Prøver med findelt væv er svære at inokulere i BacT/ALERT MP dyrkningsflasker med sikkerhedskanyler og sprøjter. For at sikre tilstrækkelig inokulation skal vævsprøver tilstrækkeligt findelt til at en passende mængde af materialet kan inokuleres i BacT/ALERT MP flaskerne. Derudover kan det være fordelagtigt at anvende store sikkerhedskanylestørrelser, eller fjerne det aftagelige låg og aseptisk tilsætte den findelte prøve, og derefter anbringe en genforsegling på BacT/ALERT MP dyrkningsflasken. Hvis der er mistanke om kontaminering af prøver med findelt væv, skal de dekontamineres og behandles, inden de overføres til BacT/ALERT MP-flasker. Dette muliggør maksimal genfinding af mycobakterier, som eventuelt er til stede.
13. Forlænget inkubation, eller tilsættelse af Mycobactin J, kan kræves når *M. malmoense* eller *M. genavense* mistænkes. *M. malmoense* og *M. genavense* er kendt som krævende forlænget inkubation udover de almindelige tider, som benyttes af mange amerikanske laboratorier.[2]
14. Det antibiotiske supplement kan muligvis hæmme væksten af visse mycobakterier på trods af supplementets nødvendighed i testningen af de fleste prøver.
15. Ved bioMérieux's kliniske evaluering var andelen af falske negativer 0,2 %.

TESTENS PRÆSTATIONSKARAKTERISTIKA

Der blev udført undersøgelser med udsåninger med de følgende organismer ved niveauer på ≤ 10^6 CFU/flaske og ≤ 10^2 CFU/flaske.

Mikroorganisme	Inokulum (CFU/flaske)	Detektionstid (dage)[1] BacT/ALERT MP (Plastik)
TB kompleks		
M. tuberculosis (4 stammer)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 stammer)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotokromogene (Runyoun I)		
M. kansasii (2 stammer)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Scotokromogene (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 stammer)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 stammer)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Ikke-pigmenterede (Runyoun III)		
M. avium (4 stammer)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 stammer)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Hurtigt voksende bakterier (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 stammer)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Hver organisme blev testet med MB/BacT antibiotisk supplement. Testning blev udført for enkeltflasker ved ≤ 10^6 og testet tre gange ved ≤ 10^2. De anførte data repræsenterer et værdiområde fra flere stammer, med undtagelse af *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. malmoense*, og *M. chelonae*, hvor data for individuelle organismer er angivet.
[2] Den ene af tre flasker viste ingen vækst efter 42 dage. Den opgivne værdi er et gennemsnit af to flasker.
[3] Én organisme, som blev testet, viste ingen vækst i tre ud af tre flasker efter 42 dage.

LITTERATURHENVISNINGER

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

BESTILLING

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/kasse	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 tests/kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 hætteglas/sæt	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 hætteglas/sæt	
BacT/ALERT® Reseal	100 enheder/kasse	REF 259787

For teknisk assistance i USA kontaktes til bioMérieux kundeservice på 1-800-682-2666. Uden for USA kontaktes den lokale repræsentant fra bioMérieux.

bioMérieux, det blå logo og BacT/ALERT er anvendte, anmeldte og/eller registrerede varemærker tilhørende bioMérieux SA eller et af dets datterselskaber.

Amphyl er et registreret varemærke tilhørende Linden Corporation.

ATCC er et registreret varemærke tilhørende American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Juli 2008

BacT/ALERT® MP

DEUTSCH

43-03064

KENNZEICHNET ÜBERARBEITETEN ABSCHNITT

Vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt bei einer Temperatur von 2 – 8 °C aufbewahren.

Siehe Symbolerläuterung am Ende dieser Beilage.

VERWENDUNGSZWECK

Das BacT/ALERT® MP-System besteht aus der BacT/ALERT MP-Kulturflasche mit abnehmbaren Verschluss, die in Verbindung mit dem MB/BacT® Antibiotic Supplement (und/oder dem MB/BacT Reconstitution Fluid) verwendet wird. Das BacT/ALERT MP-System ist zur Verwendung mit dem MB/BacT- oder dem BacT/ALERT® 3D-Mykobakteriennachweissystem beim Nachweis und der Bestimmung von Mykobakterien in sterilen Körperproben mit Ausnahme von Blut sowie in digestiv dekontaminierten klinischen Proben gedacht.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Tuberkulose ist noch immer weltweit ein großes Problem für das Gesundheitswesen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass es jedes Jahr 9 Mio. Neuerkrankungen gibt und 2 Mio. Todesfälle direkt auf diese Krankheit zurückgehen.[1] Tuberkulose wird als eine der Haupttodesursachen in vielen ressourcenarmen Ländern und Entwicklungsländern angeführt.[2] In den USA erreichte die Zahl der bei der amerikanischen Gesundheitsbehörde gemeldeten Neuerkrankungen 1992 ihren Höchstwert.[2,3] Seitdem ist die Zahl der jährlich in den USA gemeldeten Krankheitsfälle deutlich zurückgegangen, was vor allem auf die Einführung von Präventions- und Kontrollmaßnahmen in den Jahren 1989 bis 1993 zurückzuführen ist.[2] Dennoch steigt die Zahl der Krankheitsfälle in bestimmten Bevölkerungsgruppen noch immer stark an; davon betroffen sind vorwiegend Personen, die außerhalb der USA und ihrer Territorien geboren wurden. Infektionen, die von Erregern des *M. tuberculosis*-Komplexes verursacht werden, führen in der Regel zur Lungentuberkulose.

Mykobakterien, die nicht zu den Tuberkelbakterien zählen (MOTT = *Mycobacteria other than Tuberculosis*), werden hier als nichttuberkulöse Mykobakterien (NTM) bezeichnet. Die Mehrheit dieser Isolate erfordert eine Inkubation bei 35 bis 37 °C, Ausnahmen werden angegeben. Diese Erreger sind am häufigsten im Boden und in Wasser zu finden und gelten als opportunistische Pathogene bei Patienten mit Lungenkrankheiten, Immunsuppression oder perkutanem Trauma.[4] NTM, die mit Lungenkrankheiten in Verbindung gebracht werden, sind: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* und *M. xenopi* (optimale Temperatur 42 °C). *M. marinum* und *M. ulcerans,* die eine Inkubation bei 30 °C erfordern, sind NTM, die mit Hautinfektionen in Verbindung stehen. NTM, die andere Arten von Infektionen hervorrufen (z. B. Atypische Mykobakteriose, Lymphknotenentzündung usw.) sind: *M. avium*-Komplex, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum*-Komplex (*M. chelonae*-Isolate erfordern möglicherweise Inkubation bei 30 °C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* und *M. haemophilum* (erfordert Zugabe von Hämin und Inkubation bei 30 °C).[2]

Mykobakterien bilden keine Sporen und sind aerobe, nicht bewegliche, säurefeste Stäbchen, die langsam bis sehr langsam wachsen. Die Generationszeit der verschiedenen Spezies variiert zwischen 2 und >20 Std.[2] Das Anzüchten von *M. tuberculosis* mit herkömmlichen mykobakteriellen Kulturmedien kann zwei bis acht Wochen und länger dauern.[5] Die amerikanische Gesundheitsbehörde empfiehlt die Verwendung eines flüssigen Kulturmediums in Verbindung mit einem festen Medium für die Primärkultur.[6,7] Die Flüssigkulturmethode ist notwendig, um den Zeitaufwand für Nachweis, Anzüchtung und Resistenzbestimmung bei *M. tuberculosis* zu verringern.[7]

Die Mykobakteriennachweissysteme MB/BacT und BacT/ALERT 3D bieten in Verbindung mit dem BacT/ALERT MP-System sowohl ein System zum Nachweis von Mikroorganismen als auch ein Kulturmedium mit geeigneten Nährstoff- und Umgebungsbedingungen zur Ermittlung von Mykobakterienspezies, die häufig aus Patientenproben (mit Ausnahme von Blutproben) isoliert werden. Das MB/BacT Antibiotic Supplement dient dazu, die Inzidenz von Kontaminationen aufgrund von Bakterien zu verringern, die den Dekontaminations-/ Konzentrationsprozess überleben. Das MB/BacT Antibiotic Supplement muss den BacT/ALERT MP-Flaschen vor dem Inokulieren aller nichtsterilen Proben zugesetzt werden. Für den Nachweis von Mykobakterien in sterilen Proben muss den BacT/ALERT MP-Flaschen nur die Rekonstitutionsflüssigkeit zugesetzt werden. Das MB/BacT Reconstitution Fluid enthält Komponenten, die das optimale Wachstum der in der Patientenprobe vorhandenen Mykobakterien sicherstellen. Die inokulierten Fläschchen werden in das Gerät eingesetzt, wo sie inkubiert und kontinuierlich auf das Vorhandensein von Mykobakterien überwacht werden, die in der BacT/ALERT MP-Kulturflasche angezüchtet werden können.

TESTPRINZIP

Die Mykobakteriennachweissysteme MB/BacT und BacT/ALERT 3D nutzen dasselbe Testprinzip zum Nachweis von Mikroorganismen in Mykobakterienkulturen, wie das für das BacT/ALERT®-Mikrobennachweissystem und Blutkulturen beschriebene.[8] Die Mykobakteriennachweissysteme MB/BacT und BacT/ALERT 3D arbeiten mit einem kolorimetrischen Sensor und reflektiertem Licht, um das Vorhandensein und die Produktion von Kohlendioxid (CO_2) zu prüfen, das im Kulturmedium gelöst ist. Wenn die Testprobe Mikroorganismen enthält, wird durch die bakterielle Metabolisierung der Substrate im Kulturmedium CO_2 produziert. Wird durch das Wachstum der Mikroorganismen CO_2 produziert, so zeigt der gasdurchlässige Sensor am Boden der betreffenden Kulturflasche einen Farbumschlag nach Hellgrün oder Gelb. Die hellere Farbe führt zu einer Erhöhung der Reflexionseinheiten, die vom System erfasst werden. Die Flaschenreflexion wird vom Gerät alle 10 Minuten geprüft und protokolliert. Zum Zeitpunkt des Nachweises sind etwa 10^6 – 10^7 koloniebildende Einheiten (KBE) pro ml vorhanden.

REAGENZIEN

In-vitro-Diagnostikum.

WARNUNG: Zur Verringerung des Risikos eines versehentlichen Kontakts mit infektiösem Material sind zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, wenn die BacT/ALERT MP-Kulturflasche im BacT/ALERT-Mikrobennachweissystem verwendet wird. Es wird dringend empfohlen, das Gerät in einem Labor aufzustellen, das sich routinemäßig mit der Kultivierung von *M. tuberculosis* befasst. Für Aktivitäten, die die Vermehrung und Handhabung in Kultur angezüchteter Mykobakterienspezies oder *M. tuberculosis* beinhalten, werden Rückhaltevorrichtungen und Einrichtungen der Sicherheitsstufe 3 (Biosafety Level 3) empfohlen.[9]

BacT/ALERT® MP (Farbcodierung Rot) – Die BacT/ALERT MP-Kulturflaschen mit abnehmbaren Verschluss für den Einmalgebrauch enthalten 10 ml Kulturmedium und einen Kohlendioxidsensor als Indikator für das Wachstum von Mikroorganismen. Die BacT/ALERT MP-Kulturflasche kann mit einer sterilen Spritze inokuliert werden, die entweder über eine Sicherheitskanüle oder eine Kanüle mit Kunststoffhülse verfügt, oder nach Abnehmen des Verschlusses mit einem nadellosen Inokulierungsinstrument.

Das Kulturmedium besteht aus: Middlebrook 7H9-Bouillon (0,47 % Gew./Vol.), pankreatisch abgebautem Casein (0,1 % Gew./Vol.), Rinderserumalbumin (1,0 % Gew./Vol.) und Katalase (48 E/ml) in Reinstwasser. Die Flaschen enthalten 10 ml Medium und werden unter Vakuum mit einer Atmosphäre aus CO_2, Stickstoff und Sauerstoff präpariert. Die Zusammensetzung des Kulturmediums kann für spezielle Anforderungen modifiziert werden.

ACHTUNG: Die BacT/ALERT-Kulturflaschen enthalten Polycarbonat. Nicht alle Desinfektionsmittel sind für Polycarbonat-Oberflächen geeignet. Ungeeignete Produkte können das Flaschenmaterial angreifen. Vergewissern Sie sich, dass das Desinfektionsmittel für Polycarbonat geeignet ist, bevor Sie es zur Desinfektion der BacT/ALERT-Kulturflaschen verwenden.

ACHTUNG: Es ist möglich, dass bestimmte seltene und besonders anspruchsvolle Mykobakterien gar nicht oder nur langsam im Nährmedium der BacT/ALERT MP-Kulturflasche wachsen. Wenn der Verdacht auf seltene, sehr anspruchsvolle Mykobakterien besteht, die spezielle Medien und Kulturbedingungen erfordern, sollten alternative Methoden oder längere Inkubationszeiten für den Nachweis in Betracht gezogen werden.

ACHTUNG: In seltenen Fällen kann es vorkommen, dass Mikroorganismen in der BacT/ALERT MP-Kulturflasche wachsen, jedoch keine für ein positives Testergebnis ausreichende Menge an Kohlendioxid produzieren. Beispielsweise kann das Wachstum bei Proben von Patienten, die mit Antimykotika behandelt werden, geringer ausfallen.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Lyophilisierter Zusatz bestehend aus Amphotericin B (0,0180 % Gew./Vol.), Azlocillin (0,0034 % Gew./Vol.), Nalidixinsäure (0,0400 % Gew./Vol.), Polymyxin B (10.000 Einheiten), Trimethoprim (0,00105 % Gew./Vol.), Vancomycin (0,0005 % Gew./Vol.) und einem Füllstoff. Die Zusammensetzung des Zusatzes kann für spezielle Anforderungen modifiziert werden. Den Zusatz mit 10 ml MB/BacT Reconstitution Fluid rekonstituieren.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Ölsäure (0,05 % Gew./Vol.), Glycerin (5 % Gew./Vol.), Amarant (0,004 % Gew./Vol.) und Rinderserumalbumin (1 % Gew./Vol.) in Reinstwasser. Die Flaschen enthalten ein Gesamtfüllvolumen von jeweils 15 ml. Die Zusammensetzung der Rekonstitutionsflüssigkeit kann für spezielle Anforderungen modifiziert werden.

Zusätzlich benötigte Materialien

Mykobakteriennachweissystem MB/BacT oder BacT/ALERT 3D
Steriles destilliertes oder deionisiertes Wasser
Middlebrook 7H11- oder anderes Mykobakterienmedium auf Agar- oder Eibasis
Autoklav
N-Acetyl-L-Cystein-Puder
Steriler 0,067 mol Phosphatpuffer, pH 6,8
Zentrifuge
CO_2-Inkubator, 37 °C
Sterile Spritze mit Sicherheitskanüle oder einer Kanüle mit Kunststoffhülse
Sterile Pipetten oder andere sterile Inokulierungsinstrumente ohne Nadel für Flaschen, von denen die Verschlüsse entfernt wurden
BacT/ALERT® Reseal für abnehmbare Verschlüsse
Mykobakterizides Desinfektionsmittel
Mit Alkohol getränkte Tupfer
Vortex-Mixer
Sterile konische 50-ml-Polypropylen Zentrifugenröhrchen
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank
Sterile Einmalhandschuhe
Einmalkittel
Einmalmasken
Mikroskop
Materialien zum Färben von Objektträgern
Qualitätskontrollkeime

Von bioMérieux erhältliches Material

MB/BacT-Mykobakteriennachweissystem und BacT/ALERT-Mikrobennachweissystem

Vorsichtsmaßnahmen

1. POTENZIELL INFEKTIÖSES PROBENMATERIAL. Die allgemein geltenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung und Entsorgung von infektiösem Material beachten.
2. Die Arbeit mit komplexen, in Kulturen gezüchteten *M. tuberculosis*-Organismen erfordert Rückhaltevorrichtungen und Einrichtungen der Sicherheitsstufe 3 (Biosafety Level 3).[9]
3. Alle inokulierten BacT/ALERT MP-Kulturflaschen, Instrumente zur Probenentnahme, Spritzen, Pipetten oder andere nadellose Inokulierungsinstrumente müssen gemäß den Vorschriften Ihrer Einrichtung dekontaminiert werden.[2]
4. Beim Verschütten des Inhalts oder einem Leck entsteht möglicherweise ein Aerosol aus Mykobakterien (einschließlich *M. tuberculosis*) oder anderen Bakterien. Befolgen Sie die spezifischen Sicherheitsrichtlinien Ihrer Einrichtung und die CDC-/NIH-Richtlinien.[9] Phenolische Desinfektionsmittel wie Amphyl® sind für die Dekontamination von Mykobakterien und anderen Mikroorganismen geeignet.
5. Diese Kulturflaschen sollten nur von geschultem Laborpersonal verwendet werden.

Aufbewahrung

BacT/ALERT MP-Kulturflaschen und MB/BacT Antibiotic Supplement Kit sind gekühlt zu lagern (bei 2 – 8 °C). Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. BacT/ALERT MP-Kulturflaschen müssen 30 – 60 Minuten vor Verwendung aus dem Kühlschrank genommen werden, um Zimmertemperatur zu erreichen. Auf jedem Flaschenetikett ist das Verfallsdatum aufgedruckt. Die Flaschen nach Ablauf des auf dem Etikett vermerkten Monats nicht mehr verwenden.

GERÄTE

Vor Gebrauch das Benutzerhandbuch für das betreffende BacT/ALERT-Mikrobennachweissystem und die MB/BacT-Beilage zum Benutzerhandbuch lesen.

ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das richtige Vorgehen bei Gewinnung, Transport, Handhabung und Vorbereitung ist äußerst wichtig für die korrekte Analyse der Patientenkulturen auf eventuell vorhandene Mykobakterienspezies. Entnehmen und verarbeiten Sie die Proben entsprechend dem Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] oder dem für Ihr Labor geltenden Handbuch. Für die Verarbeitung unsteriler Proben wird eine Dekontamination mit N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid empfohlen.

HINWEIS: bioMérieux empfiehlt einen End-pH-Wert zwischen 6,8 – 7,2 für die Inokulumprobe.

DURCHFÜHRUNG

1. Überprüfen Sie die BacT/ALERT MP-Kulturflaschen vor Gebrauch auf Anzeichen von Beschädigung oder Qualitätsverlust (Farbverlust). Flaschen, die Anzeichen einer Beschädigung, eines Lecks oder eines Qualitätsverlusts aufweisen, müssen entsorgt werden. Das Kulturmedium sollte klar sein, bei Temperaturen unter 20 °C können sich Ausfällungen bilden. Ausfällungen nicht mit Trübung verwechseln. Bei Anzeichen einer möglichen Kontamination, d. h. bei Trübung des Mediums, einem gelb gefärbten Sensor oder zu hohem Gasdruck, die Flasche nicht mehr verwenden.
2. Vor Gebrauch müssen alle MB/BacT Reconstitution Fluid-Fläschchen auf sichtbare Beschädigungen oder Kontaminationen überprüft werden. Bei Anzeichen von Sprüngen und Undichtigkeit das betreffende Fläschchen nicht verwenden.
3. Überprüfen Sie alle Fläschchen mit MB/BacT Antibiotic Supplement vor der Verwendung auf Sprünge und Beeinträchtigung des Inhalts. Fläschchen, die Sprünge oder Zeichen einer Qualitätsminderung aufweisen, nicht verwenden.
4. Verwenden Sie Spritzen mit Sicherheitskanülen oder Spritzen mit Kanüle und Kunststoffhülse, wenn der Verschluss nicht zum Inokulieren abgenommen wird.
5. Inokulierte Kulturflaschen stets in einem Gestell oder Korb tragen.

Rekonstituieren des Zusatzes MB/BacT Antibiotic Supplement

Fügen Sie jedem Fläschchen MB/BacT Antibiotic Supplement unter aseptischen Bedingungen 10 ml MB/BacT Reconstitution Fluid hinzu. Warten Sie, bis sich der Inhalt aufgelöst hat. Schwenken Sie das Fläschchen behutsam, um den Inhalt zu mischen.

HINWEISE:
- Ein Fläschchen rekonstituiertes MB/BacT Antibiotic Supplement reicht für 20 BacT/ALERT MP-Kulturflaschen.
- Nach der Rekonstitution ist das MB/BacT Antibiotic Supplement 7 Tage haltbar, wenn es bei 2 – 8 °C aufbewahrt wird. Das Verfallsdatum des angesetzten Zusatzes sollte auf dem Etikett des Fläschchens vermerkt werden.
- Die verbleibende Rekonstitutionsflüssigkeit kann für den späteren Gebrauch mit sterilen Proben bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden.

Vorbereiten und Inokulieren der Kulturflasche

HINWEIS: Gehen Sie beim Vorbereiten der Flasche und Inokulieren der Patientenprobe mit äußerster Vorsicht vor, um eine Kontamination zu vermeiden.

1. Beschriften Sie jede BacT/ALERT MP-Kulturflasche mit den entsprechenden Patientendaten. Die Symbole auf dem Flaschenetikett (@,#,%) können vom Anwender definiert werden. Die Kulturflaschen müssen vor dem Inokulieren 30 bis 60 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen werden.
2. Desinfizieren Sie das Septum mit einem alkoholgetränkten Wattebausch o. Ä. Lassen Sie das Septum trocknen, bevor Sie der Flasche den Antibiotikazusatz bzw. die Rekonstitutionsflüssigkeit zusetzen.
3. Setzen Sie vor dem Inokulieren unter aseptischen Bedingungen jeder BacT/ALERT MP-Flasche, die zur Kultivierung unsteriler Proben verwendet werden soll, 0,5 ml des rekonstituierten MB/BacT Antibiotic Supplements zu, bzw. jeder BacT/ALERT-Kulturflasche, die zur Kultivierung steriler Proben verwendet werden soll, nur 0,5 ml MB/BacT Reconstitution Fluid. Das MB/BacT Reconstitution Fluid enthält Komponenten, die das optimale Wachstum der in den Patientenproben vorhandenen Mykobakterien sicherstellen.
   a) Geben Sie den rekonstituierten Antibiotikazusatz bzw. die Rekonstitutionsflüssigkeit unter aseptischen Bedingungen in die BacT/ALERT MP-Kulturflasche.
   b) Eine rosa Färbung des Mediums zeigt an, dass der Zusatz bzw. die Rekonstitutionsflüssigkeit erfolgreich hinzugefügt wurden.

HINWEIS: Gemäß den CDC-/NIH-Richtlinien für die Sicherheitsstufe 3 (Biosafety Level 3) müssen die folgenden Schritte in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt werden; dabei ist geeignete Schutzkleidung zu tragen.[9]

Inokulieren mit Sicherheitskanülen

1. Entnehmen Sie jede aufbereitete oder sterile Patientenprobe anhand einer Spritze mit Sicherheitskanüle oder einer Kanüle mit Hülse. Transferieren Sie unter aseptischen Bedingungen 0,5 ml in die entsprechend beschriftete BacT/ALERT MP-Kulturflasche. Ein Belüften ist nicht erforderlich. Das gleichzeitige Inokulieren herkömmlicher fester Medien wird empfohlen. Der Rest der verarbeiteten Probe kann für die spätere Verwendung bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden.
2. Wischen Sie den oberen Rand der Flaschen mit in Amphyl® 2 % oder einem anderen genehmigten tuberkuloiziden Mittel getränkter Gaze ab. Lassen Sie die Flaschen trocknen, bevor Sie sie aus der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank entnehmen.
3. Vergewissern Sie sich, dass die Reagenzien und die Probe sich in der BacT/ALERT MP-Flasche gut vermischt haben.

Inokulieren mit nadellosen Instrumenten

HINWEIS: Gehen Sie beim Vorbereiten der Flasche und Inokulieren der Patientenprobe mit äußerster Vorsicht vor, um eine Kontamination zu vermeiden.

1. Wenn Sie eine Flasche mit einem nadellosen Instrument unter aseptischen Bedingungen inokulieren möchten, befolgen Sie die nachfolgenden Anweisungen, nachdem Sie entweder den Antibiotikazusatz oder die Rekonstitutionsflüssigkeit gemäß der Anleitung in dieser Packungsbeilage zugesetzt haben.
2. Entfernen Sie den Metallverschluss, indem Sie die Zuglasche in der Mitte entlang der Oberseite und dann über den Rand des Verschlusses ziehen. Reißen Sie die Zuglasche nicht vollständig vom Verschluss ab. Ziehen Sie die Lasche um die Flasche herum, um den Verschluss vollständig von der Flasche zu entfernen.

   ACHTUNG: Beim Entfernen des metallenen Krimpverschlusses vorsichtig vorgehen. Falls sich die Zuglasche vom Rest des Verschlusses löst, so dass sich scharfe Kanten ergeben, nicht versuchen, den Verschluss von Hand zu entfernen. Stattdessen sollte eine Klemme oder ein anderes mechanisches Instrument zu Hilfe genommen werden.
3. Entfernen Sie nach dem Metallverschluss unter aseptischen Bedingungen das Septum. Das Septum lässt sich möglicherweise einfacher entfernen, wenn es auf einer der beiden eingeschnittenen Seiten aus der Flasche gezogen wird.
4. Inokulieren Sie die Probe unter aseptischen Bedingungen mithilfe eines nadellosen Instruments in die Flasche.
5. Setzen Sie das Septum unter aseptischen Bedingungen wieder in die Flasche ein, und achten Sie dabei darauf, dass die Öffnung komplett bedeckt wird. Bringen Sie einen Reseal-Verschluss (BacT/ALERT® Reseal) über dem Septum und der Flaschenöffnung an. Der Reseal-Verschluss muss unter den Flaschenrand greifen, und die Unterseite des Verschlusses muss komplett mit der Oberseite des Septums abschließen. Der Reseal-Verschluss muss fest auf der Flasche sitzen.
6. Vergewissern Sie sich, dass die Reagenzien und die Probe sich in der BacT/ALERT MP-Flasche gut vermischt haben.

Testverfahren

1. Setzen Sie die inokulierten BacT/ALERT MP-Kulturflaschen in das MB/BacT- oder BacT/ALERT 3D-Gerät. Befolgen Sie dazu die Anweisungen aus dem Benutzerhandbuch.
2. Nachdem die Kulturflaschen in das Gerät geladen wurden, sollten sie mindestens 42 Tage oder bis zu einem positiven Testergebnis darin verbleiben.
3. Wenn das Gerät eine Flasche mit positivem Ergebnis anzeigt, entnehmen Sie die Flasche gemäß den im BacT/ALERT-Benutzerhandbuch angegebenen Verfahren.
4. Alle Kulturflaschen mit positivem Testergebnis sollten durch Subkultivierung und Ausstrich auf säurefeste Stäbchen untersucht werden. Subkulturen können angelegt werden, indem die Probe mit einer Kanüle und einer Spritze aus Flaschen mit oder ohne Reseal-Verschluss entnommen werden.
   a. **Subkultivierung aus positiv getesteten Flaschen ohne Reseal-Verschluss mit einer Kanüle und Spritze:** Führen Sie folgende Schritte in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank aus: Mischen Sie den Inhalt der Flasche, desinfizieren Sie den Flaschenstopfen und entnehmen Sie eine Probe für die Säurefestigkeitsfärbung und die Subkultivierung. Desinfizieren Sie den Flaschenstopfen nach der Subkultivierung.
   b. **Subkultivierung aus positiv getesteten, mit Reseal-Verschluss versehenen Flaschen:** Ziehen Sie die Mittellasche vom Verschluss ab, und entfernen Sie den Verschluss vollständig von der Flasche. Nachdem das Septum unter aseptischen Bedingungen entfernt wurde, kann die Probe entnommen werden. Wenn die Flasche für weitere Tests aufbewahrt werden soll, setzen Sie den Stopfen unter aseptischen Bedingungen wieder auf, und verschließen Sie die Flasche mit einem neuen Reseal, der auf den Stopfen aufgebracht wird.

   Wenn der Ausstrich positiv auf säurefeste Stäbchen getestet wurde, wenden Sie zur Identifizierung der Mykobakterien die in Ihrer Einrichtung vorgeschriebenen spezifischen Verfahren an. Wenn der konzentrierte Ausstrich negativ auf säurefeste Stäbchen getestet wurde, sollte eine Gramfärbung vorgenommen werden. Ist sowohl das Ergebnis des Ausstrichs als auch der Gramfärbung negativ, handelt es sich möglicherweise um ein falsch positives Ergebnis. Laden Sie die Probe in diesem Fall wieder in das Gerät, bis in der Subkultur mikrobielles Wachstum sichtbar ist bzw. ein erneutes positives oder negatives Ergebnis festgestellt wird. Bei Kulturen, die sich nach Verdacht auf ein falsch positives Ergebnis erneut als positiv herausstellen, ist ein Ausstrich anzufertigen und eine Subkultur anzulegen.
5. Wenn nichtmykobakterielle Mikroorganismen in der Gramfärbung erkannt werden, wiederholen Sie den Dekontaminationsprozess für den gesamten Flascheninhalt und geben Sie ihn dann in eine neue BacT/ALERT MP-Kulturflasche. Alternativ können Sie die Flasche entsorgen und eine neue Probe für die Kultivierung gewinnen. Wenn in der neuen BacT/ALERT MP-Kulturflasche erneut nichtmykobakterielle Mikroorganismen wachsen, entsorgen Sie die Flasche und entnehmen Sie eine neue Probe für die Kultivierung.

6. Kulturen, die nach der maximalen Testdauer ein negatives Signal aufweisen, müssen visuell auf Trübung untersucht werden. Wenn der Inhalt der Flasche trüb ist, entnehmen Sie unter aseptischen Bedingungen eine Probe für die Säurefestigkeitsfärbung und legen Sie gemäß den Richtlinien Ihres Labors Subkulturen an. Flaschen, die keine Trübung aufweisen, können entsorgt werden. Dekontaminieren Sie alle Flaschen vor der Entsorgung.
7. Erläuterungen dazu, wie Kulturflaschen in das MB/BacT bzw. BacT/ALERT 3D-Gerät geladen und daraus entnommen werden, enthält das Benutzerhandbuch.
8. **BacT/ALERT-Kulturflaschen nicht wiederverwenden.** Entsorgen Sie die inokulierten BacT/ALERT-Kulturflaschen gemäß den Vorschriften Ihres Labors. Inokulierte BacT/ALERT-Flaschen können autoklaviert und/oder verbrannt werden.[9]

ERGEBNISSE

Ob das Ergebnis einer Kulturflasche positiv oder negativ ist, wird durch die Entscheidungssoftware des MB/BacT- bzw. BacT/ALERT 3D-Mykobakteriennachweissystems bestimmt. Nach dem Starten des Systems laufen alle Vorgänge automatisch ab. Der Anwender braucht nur die vom Gerät angezeigten Ergebnisse abzuwarten.

Ergebnisbefunde

Ergebnisse	Befund
Signal +/AFB-Ausstrich +	AFB positiv, Identifizierung ausstehend
Signal +/AFB-Ausstrich -	Kein Befund, oder Probe mit nichtmykobakteriellen Organismen kontaminiert, Vorhandensein/Nichtvorhandensein von AFB kann nicht bestimmt werden

Erstellen Sie einen vorläufigen Befund erst, nachdem Sie eine Säurefestigkeitsfärbung durchgeführt haben.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jede Packung BacT/ALERT MP-Kulturflaschen enthält eine Konformitätserklärung, die das zufriedenstellende Wachstum von *M. tuberculosis* ATCC 25177 und *M. intracellulare* ATCC 13950 zertifiziert. Nach Erhalt können neue Chargen bzw. Lieferungen von BacT/ALERT MP-Kulturflaschen oder Reagenzien für die Qualitätskontrolle getestet werden. Informationen über geeignete Qualitätskontrollkeime finden Sie in den CLSI-/NCCLS-Richtlinien M22-A3. Gehen Sie wie folgt vor, um die Flasche vorzubereiten und zu inokulieren:

1. Fügen Sie jeder zu testenden BacT/ALERT MP-Kulturflasche 0,5 ml rekonstituiertes MB/BacT Antibiotic Supplement hinzu.
2. Inokulieren Sie die repräsentativen Flaschen mit 0,5 ml der auf 10^4 KBE/ml in steriler physiologischer Kochsalzlösung oder steriler Middlebrook 7H9-Bouillon (genehmigte Charge) ohne Zusätze verdünnten Kontrollkeime.
3. Verwenden Sie nach dem Erhalt der erwarteten Ergebnisse die verbleibenden Flaschen zum Testen der klinischen Proben. Wenn die erwarteten Ergebnisse nicht erzielt werden, wenden Sie sich an den Kundendienst von bioMérieux.

Gerät

Mit jedem Gerät wird ein BacT/ALERT-Reflexionsstandard-Kit für Qualitätskontrolle und Kalibrierung mitgeliefert. Alle Qualitätskontrollverfahren sollten als Bestandteil der routinemäßigen Systemwartung durchgeführt werden. Weitere Informationen hierzu enthält das BacT/ALERT-Benutzerhandbuch.

BESCHRÄNKUNGEN DES TESTVERFAHRENS

Zahlreiche Variablen im Mykobakterien-Testverfahren sind in der Praxis nicht kontrollierbar, so dass keine absolute Sicherheit besteht, dass die erhaltenen Ergebnisse ausschließlich auf die einwandfreie bzw. verminderte Leistung des Kulturmediums oder Nachweissystems zurückzuführen sind.

1. Kulturen, die nach Beginn der antimikrobiellen Therapie für die Primärdiagnose entnommen werden, können zu negativen Ergebnissen führen.
2. Der Nachweis von Mykobakterien in den BacT/ALERT MP-Kulturflaschen ist von der Qualität der entnommenen Probe und der Anzahl kultivierbarer Keime im Probenvolumen sowie von der Nachweismethode abhängig. Die strikte Einhaltung der Verfahrensanweisungen ist für einen optimalen Nachweis von Mykobakterien entscheidend.
3. Die Zahl der Organismen ist häufig gering. Die Gewinnung von Proben über einen Zeitraum von drei aufeinander folgenden Tagen wird allgemein empfohlen.
4. Eine unzureichende Aufbereitung/Dekontamination oder Verzögerungen beim Transport der Proben können zu einem übermäßigen Wachstum von Bakterien und letztendlich zu einer kontaminierten Bouillonkultur führen. Das gesamte Kulturmedium kann kontaminiert werden, wenn auch nur ein lebensfähiges Bakterium nach der Aufbereitung in der Probe vorhanden ist.
5. Es können Kontaminanten auftreten, die gegenüber den im MB/BacT Antibiotic Supplement enthaltenen Antibiotika resistent sind.
6. Morphologie und Pigmentierung einer Kolonie sollten ausschließlich auf festen Medien bestimmt werden.
7. BacT/ALERT MP-Kulturflaschen mit einem positiven Signal können eine oder mehrere Spezies Mykobakterien und/oder andere nichtmykobakterielle Spezies enthalten. In Kulturen mit verschiedenen Mykobakterien in Bouillon setzen sich möglicherweise schnell wachsende Organismen gegenüber langsam wachsenden durch, oder die Kultur wurde gleich als nicht verwertbar eingestuft, nachdem die schnell wachsenden Organismen erkannt worden waren. Die Identifizierung vorhandener Mykobakterien erfordert die Subkultivierung und weitere Verfahren zur Identifizierung von Keimen. Die Konsistenz der mikroskopischen Morphologie in den BacT/ALERT MP-Kulturflaschen ist nicht definiert.
8. Eine Kontamination mit saprophytischen Mykobakterien im Leitungswasser oder anderen Laborreagenzien und Geräten kann zu falsch positiven „klinischen" Ergebnissen führen (Nachweis von Mykobakterien, die nicht in der klinischen Probe enthalten sind).
9. Die Dekontamination mit der N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid-Methode wird empfohlen. Andere Dekontaminierungsmethoden wurden in Verbindung mit dem BacT/ALERT MP-Kulturmedium nicht getestet. Der Einsatz digestiv dekontaminierender Reagenzien kann negative Auswirkungen auf die Mykobakterien haben.
10. Die Säurefestigkeit von Mykobakterien kann je nach Stamm, Alter der Kultur und anderen Variablen unterschiedlich sein. Alle Flaschen, die ein positives BacT/ALERT MP-Signal oder eine Trübung aufweisen, sollten sowohl in mykobakteriell selektiven als auch nichtselektiven Medien subkultiviert werden. Nichtmykobakterielle Spezies können vorhandene Mykobakterien überdecken. Kulturflaschen, bei denen dies der Fall ist, sollten dekontaminiert und neu kultiviert werden.
11. Die BacT/ALERT MP-Kulturflaschen werden bei 35 °C inkubiert, was einen Nachweis von Mykobakterien, die andere Inkubationstemperaturen erfordern, verhindert (z. B. *M. marinum, M. ulcerans* und *M. haemophilum*). Der Nachweis dieser Mikroorganismen erfordert zusätzliche Kulturmethoden. Mikroorganismen mit besonderen Wachstumsanforderungen (z. B. *M. haemophilum*) können möglicherweise in BacT/ALERT MP-Flaschen nicht nachgewiesen werden, selbst wenn sie mit der richtigen Temperatur inkubiert werden. Die folgenden Isolate wurden in analytischen Studien nachgewiesen: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* und *M. xenopi*. Die Eignung der BacT/ALERT MP-Flaschen für den Nachweis anderer weniger häufig vorkommender Isolate ist nicht bekannt.
12. Gewebeproben sind mit Sicherheitskanülen und Spritzen nur schwierig in die BacT/ALERT MP-Kulturflaschen zu inokulieren. Um eine ordnungsgemäße Inokulierung sicherzustellen, müssen die Gewebeproben fein genug zerkleinert werden, damit das Material korrekt in die BacT/ALERT MP-Flaschen inokuliert werden kann. Außerdem ist es eventuell ratsam, Sicherheitskanülen mit einem größeren Durchmesser zu verwenden. Alternativ können Sie den abnehmbaren Verschluss unter aseptischen Bedingungen entfernen, das feine Probenmaterial hinzugeben und einen Reseal-Verschluss auf die BacT/ALERT MP-Kulturflasche setzen. Wenn der Verdacht auf eine Kontamination der Gewebeproben besteht, muss das Material vor dem Inokulieren der BacT/ALERT MP-Flaschen dekontaminiert und aufbereitet werden. Dadurch wird ein optimaler Nachweis vorhandener Mykobakterien ermöglicht.
13. Eine längere Inkubationsdauer und die Zugabe von Mycobactin J sind möglicherweise erforderlich, wenn der Verdacht auf *M. malmoense* oder *M. genavense* besteht. *M. malmoense* und *M. genavense* erfordern eine Inkubationsdauer, die über die normalerweise in US-amerikanischen Labors üblichen Inkubationszeiten hinausgeht.[2]
14. Der Antibiotikazusatz ist zwar für das Testen der meisten Proben erforderlich, kann jedoch das Wachstum einiger Mykobakterien hemmen.
15. Der Anteil falsch negativer Ergebnisse betrug bei von bioMérieux durchgeführten klinischen Tests 0,2 %.

LEISTUNGSDATEN DES TESTS

Inokulierungsstudien wurden mit den folgenden Mikroorganismen bei Konzentrationen von ≤ 10^6 KBE/Flasche und ≤ 10^2 KBE/Flasche durchgeführt.

Mikroorganismus	Inokulum (KBE/Flasche)	Für den Nachweis erforderlicher Zeitraum (Tage)[1] BacT/ALERT MP (Kunststoff)
TB-Komplex		
M. tuberculosis (4 Stämme)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 Stämme)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Photochromogen (Runyoun I)		
M. kansasii (2 Stämme)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Scotochromogen (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 Stämme)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 Stämme)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Nicht chromogen (Runyoun III)		
M. avium (4 Stämme)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 Stämme)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Schnell wachsend (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 Stämme)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Jeder Mikroorganismus wurde mit MB/BacT Antibiotic Supplement getestet. Die Tests wurden für einzelne Flaschen bei ≤ 10^6 und dreifach bei ≤ 10^2 durchgeführt. Die angegebenen Daten stellen einen Bereich von Werten mehrerer Stämme dar, mit Ausnahme von *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* und *M. chelonae*, für die Daten einzelner Mikroorganismen angegeben werden.
[2] Eine von drei Flaschen zeigte nach 42 Tagen kein Wachstum, der angegebene Wert ist der Mittelwert zweier Flaschen.
[3] Ein getesteter Mikroorganismus zeigte in drei von drei Flaschen nach 42 Tagen kein Wachstum.

LITERATURHINWEISE

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

BESTELLINFORMATIONEN

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	Packung à 100 Stück	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	Kit für 100 Bestimmungen	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 Fläschchen/Kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 Fläschchen/Kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 Einheiten/Box	REF 259787

Bei technischen Fragen wenden Sie sich bitte an die Kundendienstvertretung von bioMérieux (außerhalb der USA an die nächstgelegene Vertretung, innerhalb der USA unter der Rufnummer 1-800-682-2666).

bioMérieux, das blaue Logo und BacT/ALERT sind aktuell genutzte, angemeldete und/oder registrierte Marken von bioMérieux SA oder einer ihrer Tochtergesellschaften.

Amphyl ist eine eingetragene Marke der Linden Corporation.

ATCC ist eine eingetragene Marke der American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Juli 2008

BacT/ALERT® MP

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

43-03064

ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΕΙ ΑΝΑΘΕΩΡΗΜΕΝΟ ΤΜΗΜΑ

Φυλάσσεται προστατευμένο από το άμεσο ηλιακό φως σε θερμοκρασία 2-8°C.

Ανατρέξτε στο γλωσσάριο συμβόλων στο τέλος του ένθετου.

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το σύστημα BacT/ALERT® MP αποτελείται από τη φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP με αφαιρούμενο κλείσιμο που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT® (ή/και το υγρό ανασύστασης MB/BacT). Το σύστημα BacT/ALERT MP έχει σχεδιαστεί για χρήση με τα συστήματα ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων MB/BacT ή BacT/ALERT® 3D για την ανάκτηση και τον εντοπισμό μυκοβακτηριδίων από στείρα σωματικά δείγματα εκτός του αίματος και από κλινικά δείγματα απολυμασμένα ή που προέρχονται από πέψη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η φυματίωση παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε όλο τον κόσμο. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 9 εκατομμύρια νέα κρούσματα και 2 εκατομμύρια θάνατοι αποδίδονται άμεσα στην ασθένεια κάθε χρόνο.[1] Η φυματίωση έχει καταγραφεί ως η κύρια αιτία θανάτου σε πολλές φτωχές και αναπτυσσόμενες χώρες.[2] Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το πλήθος των νέων κρουσμάτων που αναφέρθηκαν στο Κέντρο CDC έφθασε σε μέγιστη τιμή το 1992.[2,3] Από τότε, έχει παρουσιαστεί συνεπής και ουσιαστική μείωση των κρουσμάτων που αναφέρονται κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, κατά μεγάλο βαθμό λόγω της υλοποίηση μέτρων πρόληψης και ελέγχου κατά τη διάρκεια των ετών από το 1989 έως το 1993.[2] Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική αύξηση στο πλήθος των κρουσμάτων σε ορισμένες ομάδες του πληθυσμού, κυρίως μεταξύ των ατόμων που γεννιούνται εκτός των Ηνωμένων Πολιτειών και των περιφερειών τους. Οι μολύνσεις που προκαλούνται από οργανισμούς του συμπλέγματος *M. tuberculosis* είναι συνήθως πνευμονικές.

Τα μυκοβακτηρίδια εκτός του tubercle bacillus (MOTT) αναφέρονται στο παρόν ως μυκοβακτηρίδια μη φυματίωσης (NTM). Η πλειονότητα αυτών των απομονωμένων στελεχών απαιτεί επώαση στους 35 έως 37°C εκτός εάν σημειώνεται διαφορετικά. Οι οργανισμοί αυτοί βρίσκονται συνήθως στο έδαφος και στο νερό και έχουν ενοχοποιηθεί ως περιστασιακώς παθογόνοι σε ασθενείς με υποκείμενη ασθένεια των πνευμόνων, ανοσοκαταστολή ή διαδερμικό τραύμα.[4] Τα NTM που σχετίζονται με πνευμονική ασθένεια είναι: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* και *M. xenopi* (βέλτιστη θερμοκρασία 42°C). Τα *M. marinum* και *M. ulcerans*, τα οποία απαιτούν επώαση στους 30°C, είναι NTM που σχετίζονται με δερματικές μολύνσεις. Τα NTM που δημιουργούν άλλους τύπους μόλυνσης (π.χ. διάχυτη νόσο, λεμφαδενίτιδα κλπ.) είναι: MAC, σύμπλεγμα *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* (τα απομονωμένα στελέχη *M. chelonae* ενδέχεται να απαιτούν επώαση στους 30°C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* και *M. haemophilum* (απαιτεί προσθήκη αιμίνης και επώαση στους 30°C).[2]

Τα μυκοβακτηρίδια είναι αερόβιοι, μη σποριογόνοι, ακίνητοι, οξεάντοχοι βάκιλλοι με αργούς έως πολύ αργούς ρυθμούς ανάπτυξης. Οι χρόνοι δημιουργίας ποικίλλουν από 2 έως >20 hr, ανάλογα με το είδος.[2] Η ανάπτυξη του *M. tuberculosis* με τη χρήση παραδοσιακών, μυκοβακτηριδιακών μέσων μπορεί να διαρκέσει δύο έως οκτώ εβδομάδες ή και περισσότερο.[5] Το Κέντρο CDC συνιστά τη χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας, μαζί με στερεά μέσα, για την πρωτογενή καλλιέργεια.[6,7] Η μέθοδος υγρής καλλιέργειας απαιτείται για την επίτευξη πιο γρήγορης ανίχνευσης, ανάπτυξης και πιο γρήγορων αποτελεσμάτων επιδεκτικότητας για το *M. tuberculosis*.[7]

Τα συστήματα ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων MB/BacT και BacT/ALERT 3D, που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το σύστημα BacT/ALERT MP, παρέχουν τόσο ένα σύστημα ανίχνευσης μικροβίων όσο και ένα μέσο καλλιέργειας με κατάλληλες θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες για την ανάκτηση ειδών μυκοβακτηριδίων, τα οποία συνήθως απομονώνονται από δείγματα ασθενών εκτός του αίματος. Το συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT προορίζεται για τη μείωση των περιστατικών σηραντικής μόλυνσης λόγω των βακτηρίων που ενδέχεται να επιβιώσουν της διαδικασίας απολύμανσης/συγκέντρωσης. Το συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT πρέπει να προστεθεί σε φιάλες BacT/ALERT MP πριν τον ενοφθαλμισμό όλων των μη στείρων δειγμάτων. Για την ανάκτηση των μυκοβακτηριδίων που υπάρχουν σε στείρα δείγματα, θα πρέπει να προστεθεί μόνο το υγρό ανασύστασης στις φιάλες BacT/ALERT MP. Το υγρό ανασύστασης MB/BacT περιέχει συστατικά που είναι απαραίτητα για τη διασφάλιση της βέλτιστης ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων που υπάρχουν στο δείγμα του ασθενούς. Οι ενοφθαλμισμένες φιάλες τοποθετούνται στο όργανο, όπου επωάζονται και παρακολουθούνται συνεχώς για τυχόν παρουσία μυκοβακτηριδίων που θα αναπτυχθούν στη φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Τα συστήματα ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων MB/BacT και BacT/ALERT 3D χρησιμοποιούν την ίδια αρχή για τον εντοπισμό των μικροοργανισμών σε μυκοβακτηριδιακές καλλιέργειες, όπως περιγράφεται στο σύστημα ανίχνευσης μικροβίων BacT/ALERT® σε σχέση με την καλλιέργεια αίματος.[8] Τα συστήματα ανίχνευσης μικροβακτηριδίων MB/BacT και BacT/ALERT 3D χρησιμοποιούν έναν χρωματομετρικό αισθητήρα και το ανακλώμενο φως για την παρακολούθηση της παρουσίας και της παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) το οποίο είναι διαλυμένο στο μέσο της καλλιέργειας. Εάν στο δείγμα της εξέτασης υπάρχουν μικροοργανισμοί, τότε παράγεται διοξείδιο του άνθρακα, καθώς οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν τα υποστρώματα του μέσου της καλλιέργειας. Όταν, λόγω της αύξησης των μικροοργανισμών, παράγεται CO_2, το χρώμα του αερίο-διαπερατού αισθητήρα που βρίσκεται εγκατεστημένος στον πυθμένα κάθε φιάλης καλλιέργειας μεταβάλλεται σε πιο ανοικτό πράσινο ή κίτρινο. Το πιο ανοικτό χρώμα οδηγεί σε αύξηση των μονάδων ανάκλασης που παρακολουθούνται από το σύστημα. Το όργανο παρακολουθεί και καταγράφει την ανακλαστικότητα της φιάλης κάθε 10 λεπτά. Τη στιγμή της ανίχνευσης, οι μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) ανά ml είναι περίπου 10^6-10^7.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Για τη μείωση των κινδύνων από τυχαία έκθεση σε μολυσματικούς παράγοντες, θα πρέπει να λαμβάνονται πρόσθετες προφυλάξεις, κατά τη χρήση της φιάλης καλλιέργειας BacT/ALERT MP στο σύστημα ανίχνευσης μικροβίων BacT/ALERT. Συνιστάται να τοποθετείτε το όργανο σε εργαστήριο που χρησιμοποιείται για καλλιέργειες ρουτίνας του *M. tuberculosis*. Για δραστηριότητες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή και το χειρισμό του *M. tuberculosis* ή των ειδών του γένους *Mycobacterium* που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, συστήνεται η χρήση πρακτικών, εξοπλισμού συγκράτησης και εγκαταστάσεων βιοασφάλειας επιπέδου 3.[9]

BacT/ALERT® MP (με κόκκινη χρωματική κωδικοποίηση) – Οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP μίας χρήσης με αφαιρούμενο κλείσιμο περιέχουν 10 ml μέσου και έναν εσωτερικό αισθητήρα που ανιχνεύει το διοξείδιο του άνθρακα ως δείκτη της μικροβιακής ανάπτυξης. Η φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP μπορεί να ενοφθαλμιστεί μέσω αποστειρωμένης σύριγγας με προσαρτημένη βελόνα ασφάλειας ή βελόνα με περίβλημα ή αφαιρώντας το καπάκι και χρησιμοποιώντας συσκευή ενοφθαλμισμού χωρίς βελόνα.

Η σύσταση του μέσου έχει ως εξής: Ζωμός Middlebrook 7H9 (0,47% β/ό.), προϊόν παγκρεατικής πέψης καζεΐνης (0,1% β/ό.), αλβουμίνη βοείου ορού (1,0% β/ό.), καταλάση (48 u/ml), σε κεκαθαρμένο ύδωρ. Οι φιάλες περιέχουν 10 ml μέσου και προετοιμάζονται σε ατμόσφαιρα CO_2, αζώτου και οξυγόνου υπό κενό. Η σύνθεση του υλικού είναι δυνατό να προσαρμοστεί, έτσι ώστε να πληροί τις ειδικές απαιτήσεις απόδοσης.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT περιέχουν πολυανθρακικό άλας. Δεν προορίζονται όλα τα απολυμαντικά για χρήση με πολυανθρακικές επιφάνειες και ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοίωση της φιάλης. Βεβαιωθείτε για τη συμβατότητα του απολυμαντικού με το πολυανθρακικό άλας, πριν προβείτε σε χρήση του σε επιφάνειες φιαλών καλλιέργειας BacT/ALERT.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Είναι δυνατόν, ορισμένα σπάνια, απαιτητικά μυκοβακτήρια να μην αναπτύσσονται ή να αναπτύσσονται με αργό ρυθμό στο μέσο ανάπτυξης της φιάλης καλλιέργειας BacT/ALERT MP. Εάν υπάρχει υποψία παρουσίας σπάνιων, απαιτητικών μυκοβακτηρίων που απαιτούν εξειδικευμένα υλικά και συνθήκες καλλιέργειας, πρέπει να εφαρμόζονται για την ανάκτηση εναλλακτικές μέθοδοι ή παρατεταμένος χρόνος επώασης.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Σε σπάνιες περιπτώσεις, ενδέχεται να παρουσιαστούν μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στο μέσο ανάπτυξης των φιαλών καλλιέργειας BacT/ALERT MP, αλλά οι οποίοι δεν παράγουν επαρκή ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα, έτσι ώστε να χαρακτηριστούν ως θετικοί. Για παράδειγμα, δείγματα από ασθενείς που ακολουθούν θεραπεία με αντιμυκοβακτηριακούς παράγοντες ενδέχεται να εμφανίσουν περιορισμένη ανάπτυξη.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Λυοφιλοποιημένο συμπλήρωμα με σύνθεση που περιέχει αμφοτερικίνη Β (0,0180% β/ό.), αζλοκιλλίνη (0,0034% β/ό.), ναλιδιξικό οξύ (0,0400% β/ό.), πολυμυξίνη Β (10.000 μονάδες), τριμεθοπρίμη (0,00105% β/ό.), βανκομυκίνη (0,0005% β/ό.) και έναν διογκωτικό παράγοντα πριν την κατεργασία. Η σύνθεση του συμπληρώματος είναι δυνατό να προσαρμοστεί, έτσι ώστε να πληροί τις ειδικές απαιτήσεις απόδοσης. Ανασυστήστε με 10 ml υγρού ανασύστασης MB/BacT.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Ελαϊκό οξύ (0,05% β/ό.), γλυκερόλη (5% β/ό.), αμαράνθη (0,004% β/ό.) και αλβουμίνη βοείου ορού (1% β/ό.) σε κεκαθαρμένο ύδωρ. Οι φιάλες περιέχουν συνολικό όγκο 15 ml η κάθε μία. Η σύνθεση του υγρού ανασύστασης είναι δυνατό να προσαρμοστεί, έτσι ώστε να πληροί τις ειδικές απαιτήσεις απόδοσης.

Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά

Σύστημα ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων MB/BacT ή BacT/ALERT 3D
Αποστειρωμένο απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
Middlebrook 7H11 ή άλλο μυκοβακτηριδιακό άγαρ ή μέσο καλλιέργειας με βάση το αυγό
Αυτόκλειστο
Σκόνη Ν-ακετυλ-L-κυστεΐνης
Αποστειρωμένο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,067 M, pH 6,8
Συσκευή φυγοκέντρισης
Συσκευή επώασης CO_2, 37°C
Αποστειρωμένες σύριγγες με προσαρτημένες βελόνες ασφάλειας ή βελόνες με περίβλημα
Αποστειρωμένες πιπέτες ή άλλη αποστειρωμένη συσκευή ενοφθαλμισμού χωρίς βελόνα για φιάλες χωρίς κατάκι
Μέσο επανασφράγισης BacT/ALERT® για σύστημα αφαιρούμενου κλεισίματος
Μυκοβακτηριοκτόνο απολυμαντικό
Ταμπόν αλκοόλης
Αναμείκτης περιδίνησης
Αποστειρωμένοι κωνικοί σωλήνες φυγόκεντρου 50 ml από πολυπροπυλένιο
Θάλαμος βιολογικής ασφάλειας
Στείρα γάντια μίας χρήσης
Φόρμες εργαστηρίου μίας χρήσης
Μάσκες μίας χρήσης
Μικροσκόπιο
Υλικά για τη χρώση αντικειμενοφόρων πλακών
Μικροοργανισμοί ποιοτικού ελέγχου

Υλικά που διατίθενται από την bioMérieux

Σύστημα ανίχνευσης μυκοβακτηρίων MB/BacT και Συστήματα μικροβιακής ανίχνευσης BacT/ALERT

Προφυλάξεις

1. ΔΥΝΗΤΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ. Τηρείτε τις καθολικές προφυλάξεις για το χειρισμό και την απόρριψη μολυσματικών υλικών.
2. Για την εργασία με μικροοργανισμούς του συμπλέγματος *M. tuberculosis* που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, απαιτούνται πρακτικές, εξοπλισμός συγκράτησης και εγκαταστάσεις βιοασφάλειας επιπέδου 3.[9]
3. Όλες οι ενοφθαλμισμένες φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP, οι συσκευές συλλογής δειγμάτων ή άλλες συσκευές ενοφθαλμισμού χωρίς βελόνα που χρησιμοποιούνται για τον ενοφθαλμισμό, θα πρέπει να απολυμαίνονται σύμφωνα με τις διαδικασίες που εφαρμόζονται στο ίδρυμά σας.[2]
4. Σε περίπτωση έκχυσης υγρού ή διαρροής, μπορεί να δημιουργηθεί αερόλυμα μυκοβακτηριδίου (που περιλαμβάνει το *M. tuberculosis*) ή άλλου βακτηρίου. Ακολουθείτε τις ειδικές οδηγίες ασφάλειας που επιβάλλονται από το ίδρυμά σας ή το CDC/NIH.[9] Τα φαινολικά απολυμαντικά, όπως το Amphyl®, αποτελούν κατάλληλα μέσα για την απολύμανση μυκοβακτηριδίων και άλλων μικροοργανισμών.
5. Αυτές οι φιάλες καλλιέργειας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο από εκπαιδευμένο προσωπικό εργαστηρίου.

Οδηγίες φύλαξης

Φυλάσσετε τις φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP και το σετ συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT σε ψυγείο (2-8°C). Προστατεύστε από το άμεσο ηλιακό φως. Οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP πρέπει να έχουν ισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου (30-60 λεπτά) πριν χρησιμοποιηθούν. Σε κάθε ετικέτα φιάλης αναγράφεται μια ημερομηνία λήξης. Μη χρησιμοποιείτε τις φιάλες καλλιέργειας μετά την τελευταία ημέρα του μήνα που αναγράφεται στην ετικέτα.

ΟΡΓΑΝΑ

Μελετήστε το αντίστοιχο εγχειρίδιο χρήσης του συστήματος ανίχνευσης μικροβίων BacT/ALERT με το συμπλήρωμα εγχειριδίου χρήσης του MB/BacT πριν το χρησιμοποιήσετε.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η σωστή συλλογή δειγμάτων, η μεταφορά, ο χειρισμός και η παρασκευή τους είναι εξαιρετικά σημαντικά για την ακριβή ανάλυση των καλλιεργειών των ασθενών για μυκοβακτηριδιακά είδη τα οποία ενδέχεται να υπάρχουν. Η συλλογή και η επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με το εγχειρίδιο διαδικασιών κλινικής μικροβιολογίας, Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] ή, όπως ορίζεται στο εγχειρίδιο διαδικασιών του εργαστηρίου σας. Για την επεξεργασία μη στείρων δειγμάτων συστήνεται η απολύμανση με N-ακετυλ-L-κυστεΐνη/υδροξείδιο νατρίου.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η bioMérieux συστήνει, η τελική τιμή pH του ενοφθαλμισμένου δείγματος να είναι μεταξύ 6,8 -7,2.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

1. Πριν τη χρήση, οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP θα πρέπει να εξετάζονται για τυχόν ενδείξεις φθοράς ή αλλοίωσης (αποχρωματισμός). Οι φιάλες που φέρουν ίχνη φθοράς, διαρροής ή αλλοίωσης θα πρέπει να απορρίπτονται. Το μέσο θα πρέπει να είναι διαυγές, αλλά ενδέχεται να σχηματιστεί ίζημα σε θερμοκρασίες κάτω των 20°C. Μην συγχέετε την καθίζηση με τη θολερότητα. Μη χρησιμοποιείτε μια φιάλη που περιέχει υλικά τα οποία παρουσιάζουν θολερότητα, υπερβολική πίεση αερίου ή της οποίας ο αισθητήρας είναι κίτρινος. Αυτά αποτελούν ενδείξεις πιθανής μόλυνσης.
2. Πριν από τη χρήση, επιθεωρήστε οπτικά όλα τα φιαλίδια υγρού ανασύστασης MB/BacT για τυχόν ενδείξεις ζημιάς ή μόλυνσης. Εάν διαπιστώσετε οποιαδήποτε ένδειξη ρωγμής ή διαρροής σε ένα φιαλίδιο, μην το χρησιμοποιήσετε.
3. Πριν από τη χρήση, επιθεωρήστε οπτικά όλα τα φιαλίδια συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT για τυχόν ρωγμές ή αποσύνθεση του συμπυκνώματος. Εάν διαπιστώσετε ρωγμές ή αποσύνδεση σε ένα φιαλίδιο, μην το χρησιμοποιήσετε.
4. Χρησιμοποιείτε σύριγγες με βελόνα ασφάλειας ή σύριγγες με προσαρτημένη βελόνα με περίβλημα, όταν το κλείσιμο δεν αφαιρείται για τον ενοφθαλμισμό.
5. Μεταφέρετε τις ενοφθαλμισμένες φιάλες πάντα σε πλέγμα ή καλάθι.

Παρασκευή του συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT

Πριν τη χρήση, προσθέστε ασηπτικά 10 ml υγρού ανασύστασης MB/BacT σε κάθε φιαλίδιο συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT προς εξέταση. Περιμένετε να διαλυθεί το συμπύκνωμα. Ανακινήστε προσεκτικά για να αναμιχθούν τα περιεχόμενα.

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:

- Ένα φιαλίδιο ανασυσταθέντος συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT επαρκεί για 20 φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP.
- Μετά την ανασύσταση, το συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT έχει διάρκεια ζωής 7 ημερών, όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C. Η ημερομηνία λήξης για το ανασυσταθέν συμπλήρωμα πρέπει να καταγράφεται πάνω στην ετικέτα του φιαλιδίου.
- Το υγρό ανασύστασης που απομένει μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία 2-8°C για μετέπειτα χρήση με στείρα δείγματα.

Προετοιμασία και ενοφθαλμισμός φιαλών

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Προσέχετε ώστε να αποφύγετε τυχόν μόλυνση κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της φιάλης και του ενοφθαλμισμού του δείγματος του ασθενούς.

1. Σε κάθε φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP τοποθετήστε ετικέτα με τα κατάλληλα στοιχεία του ασθενούς. Τα εικονίδια στην ετικέτα της φιάλης (☺,#,⏲) είναι δυνατό να οριστούν από το χρήστη. Οι φιάλες πρέπει να έχουν ισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου (30-60 λεπτά) πριν τον ενοφθαλμισμό.
2. Απολυμάνετε το διάφραγμα με ταμπόν αλκοόλης ή αντίστοιχο υλικό. Αφήστε το διάφραγμα να στεγνώσει πριν προσθέσετε το ανασυσταθέν συμπλήρωμα αντιβιοτικών ή το υγρό ανασύστασης στη φιάλη.
3. Πριν τον ενοφθαλμισμό, προσθέστε ασηπτικά 0,5 ml ανασυσταθέντος συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT σε κάθε φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια μη στείρων δειγμάτων ή, 0,5 ml υγρού ανασύστασης MB/BacT μόνο σε κάθε φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια στείρων δειγμάτων. Το υγρό ανασύστασης MB/BacT περιέχει συστατικά που είναι απαραίτητα για τη διασφάλιση της βέλτιστης ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων που υπάρχουν στο δείγμα του ασθενούς.
   α. Μεταφέρετε ασηπτικά το ανασυσταθέν συμπλήρωμα αντιβιοτικών ή το υγρό ανασύστασης σε κάθε φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP.
   β. Μια ροζ απόχρωση στο μέσο, υποδεικνύει ότι το συμπλήρωμα ή το υγρό ανασύστασης έχει προστεθεί με επιτυχία.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να εκτελούνται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας, ενώ ο χειριστής πρέπει να φορά κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, σύμφωνα με τα πρότυπα ασφάλειας που ορίζονται από το CDC/NIH για βιοασφάλεια επιπέδου 3.[9]

Ενοφθαλμισμός με τη χρήση βελόνων ασφαλείας

1. Λάβετε κάθε επεξεργασμένο ή στείρο δείγμα σε σκευάσματος χρησιμοποιώντας σύριγγα με προσαρτημένη βελόνα ασφάλειας ή με βελόνα με περίβλημα και μεταφέρετε ασηπτικά 0,5 ml στη φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP με την κατάλληλη ετικέτα. Δεν απαιτείται αερισμός. Συστήνεται ο ταυτόχρονος ενοφθαλμισμός συμβατικών στερεών μέσων. Το επεξεργασμένο δείγμα που απομένει μπορεί να φυλαχθεί σε ψυγείο (2-8°C) για μετέπειτα χρήση.
2. Επαλείψτε το επάνω μέρος των φιαλών με γάζα εμποτισμένη με 2% Amphyl (ή άλλο εγκεκριμένο φυματιοκτόνο απολυμαντικό). Αφήστε τη φιάλη να στεγνώσει πριν την αφαιρέσετε από το θάλαμο βιολογικής ασφάλειας.
3. Βεβαιωθείτε για τη σωστή ανάμιξη των αντιδραστηρίων και του δείγματος στη φιάλη BacT/ALERT MP.

Ενοφθαλμισμός με τη χρήση συσκευών χωρίς βελόνα

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Προσέχετε ώστε να αποτρέψετε τυχόν μόλυνση κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της φιάλης και του ενοφθαλμισμού του δείγματος του ασθενούς.

1. Εάν επιλέξετε τον ασηπτικό ενοφθαλμισμό χωρίς βελόνα, ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες μετά την ασηπτική προσθήκη του συμπληρώματος αντιβιοτικών ή του υγρού ανασύστασης στη φιάλη, όπως περιγράφεται στο ένθετο της συσκευασίας.
2. Αφαιρέστε τη μεταλλική σφράγιση, τραβώντας την κεντρική γλωττίδα κατά μήκος του επάνω μέρους προς τα κάτω, μέσω του χείλους της σφράγισης. Μην αφαιρείτε πλήρως την κεντρική γλωττίδα από τη σφράγιση. Συνεχίστε να τραβάτε τη γλωττίδα γύρω από τη φιάλη για να αφαιρέσετε πλήρως τη σφράγιση από τη φιάλη.

   ΠΡΟΣΟΧΗ: Να είστε προσεκτικοί κατά την αφαίρεση της μεταλλικής σφράγισης του κλείστρου. Εάν η γλωττίδα που τραβάτε σπάσει και αποσπαστεί από τη σφράγιση με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν αιχμηρές άκρες, μην επιχειρήσετε να αφαιρέσετε τη σφράγιση με το χέρι. Στην περίπτωση αυτή συστήνεται η χρήση αιμοστατικής λαβίδας ή άλλης μηχανικής συσκευής.

3. Αφού αφαιρέσετε τη μεταλλική σφράγιση, αφαιρέστε ασηπτικά το διάφραγμα. Το διάφραγμα μπορεί να αφαιρεθεί πιο εύκολα, εάν ανασηκωθεί από τη φιάλη, σε κάποια πλευρά της σχισμής του διαφράγματος.
4. Πραγματοποιήστε ασηπτικό ενοφθαλμισμό του δείγματος στη φιάλη, χρησιμοποιώντας συσκευή χωρίς βελόνα.
5. Τοποθετήστε ασηπτικά το διάφραγμα ξανά στη φιάλη και βεβαιωθείτε ότι έχει προσαρμοστεί πλήρως στο άνοιγμα. Τοποθετήστε μέσο επανασφράγισης (μέσο επανασφράγισης BacT/ALERT®) πάνω από το διάφραγμα και το άνοιγμα της φιάλης. Το μέσο επανασφράγισης πρέπει να ασφαλίσει πάνω στο χείλος της φιάλης και το κάτω μέρος του πρέπει να έρθει σε πλήρη επαφή με το επάνω μέρος του διαφράγματος. Το μέσο επανασφράγισης θα πρέπει να προσαρμόζεται σφιχτά στη φιάλη.
6. Βεβαιωθείτε για τη σωστή ανάμιξη των αντιδραστηρίων και του δείγματος στη φιάλη BacT/ALERT MP.

Διαδικασία εξέτασης

1. Τοποθετήστε τις ενοφθαλμισμένες φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP στο όργανο MB/BacT ή BacT/ALERT 3D, ακολουθώντας τις οδηγίες που παρέχονται στο αντίστοιχο εγχειρίδιο χρήσης.
2. Αφού οι φιάλες καλλιέργειας εισαχθούν στο όργανο, θα πρέπει να παραμείνουν εκεί για 42 ημέρες ή έως ότου χαρακτηριστούν ως θετικές.
3. Όταν το όργανο υποδείξει μια θετική φιάλη, αφαιρέστε τη φιάλη σύμφωνα με τις διαδικασίες που αναφέρονται στο εγχειρίδιο χρήσης BacT/ALERT.
4. Από όλες τις φιάλες που έχουν χαρακτηριστεί θετικές, θα πρέπει να λαμβάνονται επιχρίσματα και να διενεργείται ανακαλλιέργεια για οξεοάντοχους βακίλους. Η ανακαλλιέργεια μπορεί να πραγματοποιηθεί με αφαίρεση του δείγματος με βελόνα και σύριγγα από τις φιάλες που δεν έχουν επανασφραγιστεί ή από φιάλες που έχουν επανασφραγιστεί.
   α. **Ανακαλλιέργεια από θετικές φιάλες χωρίς επανασφράγιση, με τη χρήση βελόνας και σύριγγας.** Σε ένα θάλαμο βιολογικής ασφάλειας, αναμίξτε το περιεχόμενο της φιάλης, απολυμάνετε το πώμα της φιάλης και αφαιρέστε δείγμα για οξεάντοχη χρώση και ανακαλλιέργεια. Απολυμάνετε το πώμα της φιάλης μετά την ανακαλλιέργεια.
   β. **Ανακαλλιέργεια από θετικές φιάλες με επανασφράγιση.** Τραβήξτε και αφαιρέστε την κεντρική γλωττίδα από το μέσο επανασφράγισης και αφαιρέστε πλήρως τη σφράγιση από τη φιάλη. Μετά την ασηπτική αφαίρεση του διαφράγματος, το δείγμα μπορεί να αφαιρεθεί. Εάν θέλετε να διατηρήσετε τη φιάλη για περαιτέρω εξέταση, τοποθετήστε ξανά ασηπτικά το πώμα και τοποθετήστε νέο μέσο επανασφράγισης πάνω από το πώμα και τη φιάλη.

   Εάν το οξεοάντοχο επίχρισμα είναι θετικό, συνεχίστε με τις ειδικές διαδικασίες προσδιορισμού μυκοβακτηρίων που εφαρμόζονται στο ίδρυμά σας. Εάν το συμπυκνωμένο επίχρισμα είναι αρνητικό για οξεάντοχους βάκιλλους, θα πρέπει να εκτελεστεί χρώση κατά Gram. Εάν η οξεάντοχη χρώση επιχρίσματος και η χρώση κατά Gram είναι αρνητικές, που σημαίνει πιθανώς ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, η φιάλη θα πρέπει να τοποθετηθεί ξανά στο όργανο, μέχρι να αναπτυχθεί η ανακαλλιέργεια ή μέχρι τον επαναχαρακτηρισμό της ως θετικής ή αρνητικής. Από καλλιέργειες που προσδιορίστηκαν αρχικά ως ψευδώς θετικές και επαναχαρακτηρίστηκαν ως θετικές θα πρέπει να λαμβάνεται επίχρισμα και να διενεργείται ανακαλλιέργεια.

5. Εάν εμφανιστούν μη μυκοβακτηριδιακοί μικροοργανισμοί στη χρώση κατά Gram, θα πρέπει να γίνει ανακατεργασία ολόκληρου του περιεχομένου της φιάλης, μέσω άλλης διαδικασίας απολύμανσης και ενοφθαλμισμός σε νέα φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP ή, το περιεχόμενο θα πρέπει να απορριφθεί και να ληφθεί άλλο δείγμα για καλλιέργεια. Εάν στη νέα φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP αναπτυχθούν ξανά μη μυκοβακτηριδιακοί οργανισμοί, απορρίψτε το περιεχόμενο και λάβετε νέο δείγμα για καλλιέργεια.
6. Οι καλλιέργειες που χαρακτηρίζονται ως αρνητικές στο μέγιστο χρόνο εξέτασης, θα πρέπει να εξετάζονται οπτικά για θολερότητα. Εάν το περιεχόμενο της φιάλης είναι θολό, λάβετε ασηπτικά ένα δείγμα για επίχρισμα οξέαντοχων μικροοργανισμών και ανακαλλιέργεια, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου σας. Οι φιάλες που δεν παρουσιάζουν θολερότητα μπορούν να απορριφθούν. Απολυμάνετε όλες τις φιάλες πριν τις απορρίψετε.
7. Στο εγχειρίδιο χρήσης παρέχονται διαδικασίες για την εισαγωγή και την αφαίρεση των φιαλών καλλιέργειας στο όργανο MB/BacT ή BacT/ALERT 3D.
8. **Μην επαναχρησιμοποιείτε τις φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT.** Απορρίψτε τις ενοφθαλμισμένες φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου σας. Συστήνεται η χρήση αυτόκλειστου ή/και η αποτέφρωση για τις ενοφθαλμισμένες φιάλες BacT/ALERT.[9]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο χαρακτηρισμός των φιαλών καλλιέργειας ως θετικών ή αρνητικών γίνεται από λογισμικό λήψης αποφάσεων που συνοδεύει τα συστήματα ανίχνευσης μυκοβακτηριδίων MB/BacT ή BacT/ALERT 3D. Δεν απαιτείται καμία ενέργεια έως ότου το όργανο χαρακτηρίσει τις φιάλες καλλιέργειας ως θετικές ή αρνητικές.

Αναφορά αποτελεσμάτων

Αποτελέσματα	Αναφορά
Signal +/AFB Smear +	AFB θετικό, εκκρεμεί ταυτοποίηση
Signal +/AFB Smear –	Καμία αναφορά ή δείγμα που έχει μολυνθεί με μη μυκοβακτηριδιακούς μικροοργανισμούς, δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός παρουσίας/απουσίας AFB

Αναφέρετε τα προκαταρκτικά αποτελέσματα μόνο μετά την εκτέλεση χρώσης οξέαντοχων μικροοργανισμών.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ένα Πιστοποιητικό Συμμόρφωσης παρέχεται με κάθε συσκευασία φιαλών καλλιέργειας BacT/ALERT MP, υποδεικνύοντας την ικανοποιητική απόδοση ανάπτυξης των *M. tuberculosis* ATCC 25177 και *M. intracellulare* ATCC 13950. Κατά την παραλαβή, οι νέες παρτίδες φιαλών καλλιέργειας BacT/ALERT MP ή αντιδραστηρίων θα πρέπει να υποβάλλονται σε ποιοτικό έλεγχο. Ανατρέξτε στο CLSI/NCCLS M22-A3 για τους κατάλληλους μικροοργανισμούς ποιοτικού ελέγχου. Ακολουθήστε τη διαδικασία προετοιμασίας και ενοφθαλμισμού των φιαλών:

1. Προσθέστε 0,5 ml επανενυδατωμένου συμπληρώματος αντιβιοτικών MB/BacT Antibiotic σε κάθε φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP προς εξέταση.
2. Ενοφθαλμίστε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα φιαλών με 0,5 ml μικροοργανισμών ελέγχου, αραιωμένα σε 10^4 CFU/ml στείρου φυσιολογικού αλατούχου διαλύματος ή στείρου ζωμού Middlebrook 7H9 χωρίς συμπλήρωμα (εγκεκριμένη παρτίδα).
3. Αφού λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, χρησιμοποιήστε τις υπόλοιπες φιάλες για την εξέταση κλινικών δειγμάτων. Εάν δεν λάβετε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, επικοινωνήστε με το Τμήμα Εξυπηρέτησης Πελατών της bioMérieux.

Όργανο

Κάθε όργανο συνοδεύεται από ένα σετ προτύπων ανάκλασης BacT/ALERT για τη διενέργεια των διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου και βαθμονόμησης. Όλες οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να εκτελούνται στα πλαίσια της κανονικής συντήρησης του συστήματος. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο εγχειρίδιο χρήσης του BacT/ALERT.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Πολλές μεταβλητές που ενέχονται σε δοκιμασία μυκοβακτηρίων δεν είναι δυνατόν να ελεγχθούν πρακτικά για την παροχή πλήρους εμπιστοσύνης ότι τα ληφθέντα αποτελέσματα οφείλονται αποκλειστικά στη σωστή ή την εσφαλμένη απόδοση οποιουδήποτε υλικού καλλιέργειας ή συστήματος ανίχνευσης.

1. Οι καλλιέργειες που λαμβάνονται για την αρχική διάγνωση μετά την έναρξη αντιμικροβιακής θεραπείας, ενδέχεται να δώσουν αρνητικά αποτελέσματα.
2. Η ανάκτηση μυκοβακτηριδίων στις φιάλες BacT/ALERT MP εξαρτάται από την ποιότητα του δείγματος που έχει συλλεχθεί, το πλήθος των καλλιεργίσιμων μικροοργανισμών στον όγκο του δείγματος και τη μέθοδο επεξεργασίας. Η τήρηση των οδηγιών για τις διαδικασίες είναι κρίσιμη για τη βέλτιστη ανάκτηση μυκοβακτηριδίων.
3. Οι μικροοργανισμοί είναι συνήθως μικρού πλήθους. Συνιστάται γενικά η συλλογή δειγμάτων σε τρεις συνεχόμενες ημέρες.
4. Η εσφαλμένη επεξεργασία/απολύμανση ή η καθυστέρηση στη μεταφορά των δειγμάτων μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική ανάπτυξη βακτηρίων, με αποτέλεσμα την πιθανή μόλυνση της καλλιέργειας του ζωμού. Ολόκληρο το μέσο καλλιέργειας μπορεί να μολυνθεί, εάν υπάρχει ακόμη και ένα βιώσιμο βακτήριο στο δείγμα μετά την επεξεργασία.
5. Ενδέχεται να υπάρχουν μολυσματικοί παράγοντες, ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά τα οποία περιέχονται στο συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT.
6. Η μορφολογία και η χρώση αποικιών πρέπει να προσδιορίζεται μόνο σε στερεό υλικό.
7. Οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP με θετικό αποτέλεσμα ενδέχεται να περιέχουν ένα ή περισσότερα είδη μυκοβακτηριδίων ή/κι άλλα είδη μη μυκοβακτηριδίων. Σε μικτές καλλιέργειες μυκοβακτηριδίων σε ζωμό, ένας βραδέως αναπτυσσόμενος μικροοργανισμός ενδέχεται να υποσκελίζεται από έναν ταχέως αναπτυσσόμενο μικροοργανισμό ή η καλλιέργεια μπορεί να απορριφθεί νωρίς, μετά την ανίχνευση του ταχέως αναπτυσσόμενου. Η ταυτοποίηση των μυκοβακτηριδίων που υπάρχουν, απαιτεί ανακαλλιέργεια και πρόσθετες διαδικασίες για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Η συνέπεια της μικροσκοπικής μορφολογίας στις φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP δεν έχει προσδιοριστεί.
8. Η μόλυνση με σαπροφυτικά μυκοβακτηρίδια στο νερό της βρύσης ή άλλα εργαστηριακά αντιδραστήρια και εξοπλισμό, μπορεί να οδηγήσει σε "κλινικά" ψευδώς θετικά αποτελέσματα (ανάκτηση μυκοβακτηριδίων όχι σε κλινικό δείγμα).
9. Συστήνεται η απολύμανση με τη μέθοδο N-ακετυλ-L-κυστεΐνης/υδροξείδιου του νατρίου. Άλλες μέθοδοι απολύμανσης δεν έχουν ελεγχθεί σε συνδυασμό με το μέσο καλλιέργειας BacT/ALERT MP. Τα αντιδραστήρια πέψης / απολύμανσης ενδέχεται να έχουν βλαβερές επιπτώσεις στα μυκοβακτηρίδια.
10. Τα μυκοβακτηρίδια ενδέχεται να παρουσιάζουν διαφορετική οξεαντοχή, ανάλογα με τη χρήση, την ηλικία της καλλιέργειας και άλλες μεταβλητές. Όλες οι φιάλες BacT/ALERT MP που χαρακτηρίζονται ως θετικές ή εμφανίζουν θολερότητα θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανακαλλιέργεια τόσο σε εκλεκτικά μέσα ως προς μυκοβακτηρίδια όσο και σε μη εκλεκτικά μέσα. Τα μη μυκοβακτηριδιακά είδη ενδέχεται να προκαλούν υπερβολική ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων που υπάρχουν. Αυτές οι φιάλες καλλιέργειας θα πρέπει να απολυμαίνονται και να υποβάλλονται σε ανακαλλιέργεια.
11. Οι φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP επωάζονται στους 35°C εμποδίζοντας την ανάκτηση μυκοβακτηριδίων που απαιτούν άλλες θερμοκρασίες επώασης (π.χ., *M. marinum*, *M. ulcerans* και *M. haemophilum*). Η ανάκτηση τέτοιων μικροοργανισμών απαιτεί πρόσθετες μεθόδους καλλιέργειας. Οι μικροοργανισμοί με ειδικές απαιτήσεις ανάπτυξης (π.χ., *M. haemophilum*) ενδέχεται να μην ανακτηθούν σε φιάλες BacT/ALERT MP, όταν αυτές επωάζονται στην κατάλληλη θερμοκρασία. Τα παρακάτω απομονωμένα στελέχη έχουν ανακτηθεί σε αναλυτικές μελέτες: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* και *M. xenopi*. Η δυνατότητα των φιαλών BacT/ALERT MP για ανάκτηση άλλων, μη συνηθισμένων απομονωμένων στελεχών δεν είναι γνωστή.
12. Αλεσμένα δείγματα ιστών είναι δύσκολο να ενοφθαλμιστούν σε φιάλες καλλιέργειας BacT/ALERT MP με βελόνες ασφάλειας και σύριγγες. Προκειμένου να διασφαλιστεί ο επαρκής ενοφθαλμισμός, τα δείγματα ιστών πρέπει να αλεστούν σε λεπτούς κόκκους έτσι, ώστε να επιτρέπεται ο επαρκής ενοφθαλμισμός του υλικού στις φιάλες BacT/ALERT MP. Επιπλέον, συστήνεται η χρήση μεγαλύτερων βελόνων ασφάλειας ή η αφαίρεση του αφαιρούμενου κλεισίματος, η ασηπτική προσθήκη του αλεσμένου δείγματος και η εφαρμογή μέσου επανασφράγισης στη φιάλη καλλιέργειας BacT/ALERT MP. Εάν υπάρχει υποψία μόλυνσης των αλεσμένων δειγμάτων ιστών, απολυμάνετε και επεξεργαστείτε τα δείγματα πριν την προσθήκη τους σε φιάλες BacT/ALERT MP. Έτσι, θα είναι εφικτή η μέγιστη ανάκτηση των μυκοβακτηριδίων που ενδέχεται να υπάρχουν.
13. Η παρατεταμένη επώαση ή η προσθήκη του Mycobactin J ενδέχεται να απαιτείται εάν υπάρχει υποψία για *M. malmoense* ή *M. genavense*. Τα *M. malmoense* και *M. genavense* είναι γνωστό ότι απαιτούν εκτεταμένη επώαση, πέραν των κανονικών προγραμμάτων που χρησιμοποιούνται σε πολλά εργαστήρια των Ηνωμένων Πολιτειών.[2]
14. Το συμπλήρωμα αντιβιοτικών, παρόλο που είναι απαραίτητο για την εξέταση των περισσότερων δειγμάτων, ενδέχεται να παρεμποδίζει την ανάπτυξη ορισμένων μυκοβακτηριδίων.
15. Το ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από κλινικές αξιολογήσεις της bioMérieux ήταν 0,2 %.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Μελέτες με εμβολιασμό εκτελέστηκαν με τη χρήση των ακόλουθων μικροοργανισμών σε επίπεδα ≤ 10^6 CFU/φιάλη και ≤ 10^2 CFU/φιάλη.

Μικροοργανισμός	Ενοφθάλμισμα (CFU/φιάλη)	Χρόνος έως την ανίχνευση (ημέρες)[1] BacT/ALERT MP (Πλαστική φιάλη)
Σύμπλεγμα TB		
M. tuberculosis (4 στελέχη)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 στελέχη)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Φωτοχρωμογόνα (Runyoun I)		
M. kansasii (2 στελέχη)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Σκοτοχρωμογόνα (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 στελέχη)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 στελέχη)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Μη χρωμογόνα (Runyoun III)		
M. avium (4 στελέχη)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 στελέχη)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Ταχείας ανάπτυξης (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 στελέχη)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Κάθε μικροοργανισμός έχει εξετασθεί με συμπλήρωμα αντιβιοτικών MB/BacT. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε για απλές φιάλες σε ≤ 10^6 και εις τριπλούν σε ≤ 10^2. Τα αναγραφόμενα δεδομένα αποτελούν ένα εύρος τιμών από πολλαπλά στελέχη, εκτός των *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* και *M. chelonae* όπου δίνονται δεδομένα για μεμονωμένους μικροοργανισμούς.

[2] Μία από τις τρεις φιάλες δεν παρουσίασε ανάπτυξη μετά από 42 ημέρες, η τιμή που δίνεται είναι ο μέσος όρος των δύο φιαλών.

[3] Ένας μικροοργανισμός που ελέγχθηκε δεν παρουσίασε ανάπτυξη για τις τρεις από τις τρεις φιάλες μετά από 42 ημέρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/θήκη	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 εξετάσεις/σετ	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 φιαλίδια/σετ	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 φιαλίδια/σετ	
BacT/ALERT® Reseal	100 μονάδες/κουτί	REF 259787

Για τεχνική βοήθεια εντός των Η.Π.Α., επικοινωνήστε με την Υπηρεσία Εξυπηρέτησης Πελατών της bioMérieux στο τηλέφωνο 1-800-682-2666. Εκτός των Η.Π.Α., επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της bioMérieux.

Η ονομασία bioMérieux, ο κυανός λογότυπος και η ονομασία BacT/ALERT αποτελούν χρησιμοποιημένα, κατατεθειμένα ή/και καταχωρημένα εμπορικά σήματα που ανήκουν στη bioMérieux SA ή μιας εκ των θυγατρικών της.

Η ονομασία Amphyl αποτελεί κατατεθειμένο εμπορικό σήμα της Linden Corporation.

Η ονομασία ATCC αποτελεί χρησιμοποιημένο, κατατεθειμένο ή/ και καταχωρημένο εμπορικό σήμα που ανήκει στην American Type Culture Collection

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Ιούλιος 2008

BacT/ALERT® MP

ESPAÑOL

43-03064

INDICA SECCIÓN MODIFICADA

Conservar a 2-8 °C protegido de la luz directa del sol.

Véase al final del prospecto el glosario de símbolos.

USO PREVISTO

El sistema BacT/ALERT® MP está compuesto del frasco de cultivo BacT/ALERT MP con un cierre extraíble utilizado junto con el suplemento antibiótico MB/BacT® (y/o el líquido para reconstitución MB/BacT). El sistema BacT/ALERT MP está diseñado para utilizarse con los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT o BacT/ALERT® 3D para la recuperación y detección de micobacterias en muestras corporales estériles no hemáticas y en muestras clínicas sometidas a digestión-descontaminación.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tuberculosis sigue siendo un problema global importante para la salud pública. La Organización Mundial de la Salud calcula que 9 millones de casos nuevos y 2 millones de muertes son directamente atribuibles a esta enfermedad cada año[1]. Se ha citado la tuberculosis como la principal causa de muerte en muchos países en desarrollo y con recursos escasos[2]. En Estados Unidos, el número de casos nuevos comunicados a los CDC alcanzó su nivel máximo en 1992[2,3]. Desde entonces se ha producido un descenso constante e importante del número de casos comunicados cada año en Estados Unidos, debido en gran medida a la aplicación de medidas de prevención y control entre 1989 y 1993[2]. Sin embargo, sigue existiendo un aumento importante del número de casos en algunos grupos de población, especialmente en personas nacidas fuera de Estados Unidos y sus territorios. Las infecciones causadas por los microorganismos del complejo *M. tuberculosis* son clásicamente pulmonares.

En este documento nos referiremos al conjunto de micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT, por su nombre en inglés) como micobacterias no tuberculosas (MNT). La mayoría de estas cepas requiere incubación a 35-37 °C salvo que se indique lo contrario. Estos microorganismos suelen estar presentes en el suelo y en el agua, y han sido relacionados como patógenos oportunistas en pacientes con enfermedad pulmonar subyacente, inmunodepresión o traumatismos percutáneos[4]. Las MNT asociadas a enfermedad pulmonar son: complejo *M. avium* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* y *M. xenopi* (temperatura óptima de 42 °C). *M. marinum* y *M. ulcerans*, que requieren incubación a 30 °C, son MNT asociadas a infecciones cutáneas. Las MNT que producen otros tipos de infección (p. ej., enfermedad diseminada, linfoadenitis, etc.) son: MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum,* complejo *M. fortuitum* (las cepas aisladas de *M. chelonae* pueden requerir incubación a 30 °C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* y *M. haemophilum* (requiere la adición de hemina e incubación a 30 °C)[2].

Las micobacterias son bacilos aerobios, acidorresistentes, no formadores de esporas y sin movilidad que tienen un crecimiento lento o muy lento; los tiempos de generación de las especies varían entre 2 y > 20 horas dependiendo de la especie[2]. El crecimiento de *M. tuberculosis* en medios de cultivo micobacterianos tradicionales puede llevar entre dos y ocho semanas o más[5]. Las recomendaciones de los CDC sugieren el uso de un medio de cultivo líquido, junto con medios de cultivo sólidos, para el cultivo primario[6,7]. El método de cultivo líquido es necesario para proporcionar una detección, un crecimiento y resultados de sensibilidad de *M. tuberculosis* más rápidos[7].

Los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT y BacT/ALERT 3D, utilizados junto con el sistema BacT/ALERT MP, proporcionan un sistema de detección de microorganismos y un medio de cultivo con condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para recuperar especies de micobacterias aisladas habitualmente en muestras no hemáticas de pacientes. El suplemento antibiótico MB/BacT está indicado para reducir la incidencia de contaminación intercurrente debida a bacterias que pueden sobrevivir al proceso de descontaminación/concentración. El suplemento antibiótico MB/BacT debe añadirse a los frascos BacT/ALERT MP antes de la inoculación de todas las muestras no estériles. Para la recuperación de micobacterias presentes en muestras estériles, sólo debe añadirse el líquido para reconstitución a los frascos BacT/ALERT MP. El líquido para reconstitución MB/BacT contiene componentes necesarios para garantizar el crecimiento óptimo de las micobacterias presentes en la muestra del paciente. Los frascos inoculados se colocan en el instrumento, donde se incuban y controlan continuamente para determinar la posible presencia de micobacterias que crecerán en el frasco de cultivo BacT/ALERT MP.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT y BacT/ALERT 3D utilizan el mismo principio para detectar microorganismos en cultivos micobacterianos tal como se describe para el sistema de detección de microorganismos BacT/ALERT® con respecto a los hemocultivos[8]. Los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT y BacT/ALERT 3D utilizan un sensor colorimétrico y la luz reflejada para controlar la presencia y la producción de dióxido de carbono (CO_2) disuelto en el medio de cultivo. Si hay microorganismos en la muestra, se producirá dióxido de carbono a medida que éstos metabolicen los sustratos presentes en el medio de cultivo. Cuando el crecimiento de los microorganismos produce CO_2, el color del sensor permeable al gas instalado en el fondo de cada frasco de cultivo cambia a un color verde más claro o amarillo. Este color más claro provoca un aumento de las unidades de reflectancia controladas por el sistema. El instrumento controla y registra la reflectancia del frasco cada 10 minutos. En el momento de la detección, el número aproximado de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro es de 10^6-10^7.

REACTIVOS

Para uso diagnóstico *in vitro*.

ADVERTENCIA: Para reducir los riesgos de exposición accidental a agentes infecciosos, deben tomarse precauciones adicionales cuando se utilicen los frascos de cultivo BacT/ALERT MP en el sistema de detección de microorganismos BacT/ALERT. Es muy recomendable instalar el instrumento en un laboratorio que se utilice para el cultivo sistemático de *M. tuberculosis*. Para las actividades que requieran la propagación y manipulación de *M. tuberculosis* o especies de *Mycobacterium* crecidas en cultivo, se recomienda el uso de prácticas, equipo de contención e instalaciones de nivel 3 de seguridad biológica[9].

BacT/ALERT® MP (color rojo): los frascos de cultivo desechables BacT/ALERT MP con cierre extraíble contienen 10 ml de medio de cultivo y un sensor interno que detecta el dióxido de carbono como indicador del crecimiento microbiano. El frasco de cultivo BacT/ALERT MP puede inocularse por medio de una jeringa estéril con una aguja de bloqueo o una aguja con funda protectora conectada, o retirando el cierre y utilizando un dispositivo de inoculación sin aguja.

La formulación del medio de cultivo está compuesta de: caldo de Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), digerido pancreático de caseína (0,1% p/v), seroalbúmina bovina (1,0% p/v) y catalasa (48 u/ml) en agua purificada. Los frascos contienen 10 ml de medio de cultivo, y se preparan con una atmósfera de CO_2, nitrógeno y oxígeno al vacío. Es posible ajustar la composición del medio para que cumpla requisitos de rendimiento específicos.

PRECAUCIÓN: Los frascos de cultivo BacT/ALERT contienen policarbonato. No todos los desinfectantes están indicados para usarse con superficies de policarbonato, y pueden causar el deterioro del frasco. Comprobar la compatibilidad del desinfectante con el policarbonato antes de usarlo en las superficies de los frascos de cultivo BacT/ALERT.

PRECAUCIÓN: Es posible que determinadas micobacterias exigentes raras no crezcan o crezcan lentamente en el medio de crecimiento del frasco de cultivo BacT/ALERT MP. Si se sospecha la presencia de micobacterias exigentes raras que requieren medios y condiciones de cultivo especiales, debe considerarse la posibilidad de utilizar métodos alternativos o tiempos de incubación ampliados para su recuperación.

PRECAUCIÓN: En raras ocasiones pueden encontrarse microorganismos que crezcan en el medio de crecimiento de los frascos de cultivo BacT/ALERT MP, pero sin que produzcan suficiente dióxido de carbono para dar un resultado positivo. Por ejemplo, las muestras de pacientes que estén recibiendo tratamiento con fármacos antimicobacterianos pueden mostrar un crecimiento deficiente.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement: suplemento liofilizado cuya formulación contiene anfotericina B (0,0180% p/v), azlocilina (0,0034% p/v), ácido nalidíxico (0,0400% p/v), polimixina B (10.000 unidades), trimetoprima (0,00105% p/v), vancomicina (0,0005% p/v) y un agente de carga antes del procesamiento. Es posible ajustar la composición del suplemento para que cumpla requisitos de rendimiento específicos. Reconstituir con 10 ml de líquido para reconstitución MB/BacT.

MB/BacT® Reconstitution Fluid: ácido oleico (0,05% p/v), glicerol (5% p/v), amaranto (0,004% p/v) y seroalbúmina bovina (1% p/v) en agua purificada. Los frascos contienen un volumen total de llenado de 15 ml cada uno. Es posible ajustar la composición del líquido para reconstitución para que cumpla requisitos de rendimiento específicos.

Materiales adicionales requeridos

Sistema de detección de micobacterias MB/BacT o BacT/ALERT 3D
Agua destilada o desionizada estéril
Caldo de Middlebrook 7H11 u otro agar micobacteriano o medio de cultivo a base de huevo
Autoclave
N-acetil-L-cisteína en polvo
Tampón fosfato 0,067 M estéril, pH 6,8
Centrífuga
Incubadora de CO_2, 37 °C
Jeringas estériles con agujas de bloqueo o agujas con funda protectora conectadas
Pipetas estériles u otro dispositivo de inoculación sin aguja estéril para los frascos con cierres extraídos
Precinto BacT/ALERT® para el sistema de cierre extraíble
Desinfectante micobactericida
Gasas de algodón impregnadas en alcohol
Vortex
Tubos cónicos de polipropileno estériles de 50 ml para centrífuga
Cabina de seguridad biológica
Guantes estériles desechables
Batas desechables
Mascarillas desechables
Microscopio
Materiales para la tinción de portaobjetos
Microorganismos de control de calidad

Materiales disponibles en bioMérieux

Sistema de detección de micobacterias MB/BacT y sistemas de detección de microorganismos BacT/ALERT

Precauciones

1. MUESTRA DE ESTUDIO POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Observar las precauciones universales al manipular y desechar materiales infecciosos.
2. El trabajo con microorganismos del complejo *M. tuberculosis* crecidos en cultivo requiere prácticas, equipo de contención e instalaciones de nivel 3 de seguridad biológica[9].
3. Todos los frascos de cultivo BacT/ALERT MP inoculados, los dispositivos de recogida de muestras, las jeringas, las pipetas y otros dispositivos de inoculación sin aguja utilizados para la inoculación deben ser descontaminados de acuerdo con los procedimientos del centro[2].
4. En caso de derramamiento o fuga, podría producirse un aerosol de micobacterias (incluida *M. tuberculosis*) u otras bacterias. Siga las directrices de seguridad específicas de su centro y de los CDC/NIH[9]. Los desinfectantes fenólicos tales como Amphyl® son productos adecuados para la descontaminación de micobacterias y otros microorganismos.
5. Estos frascos de cultivo deben ser utilizados exclusivamente por personal de laboratorio con la formación adecuada.

Instrucciones de conservación

Conservar los frascos de cultivo BacT/ALERT MP y los envases de suplemento antibiótico MB/BacT en condiciones de refrigeración (2-8 °C). Proteger de la luz directa del sol. Debe dejarse que los frascos de cultivo BacT/ALERT MP se atemperen (30-60 minutos) antes de su uso. En la etiqueta de cada frasco viene impresa la fecha de caducidad. No utilizar los frascos de cultivo después del último día del mes indicado.

INSTRUMENTOS

Consultar el manual del usuario del sistema de detección de microorganismos BacT/ALERT correspondiente con el suplemento del manual del usuario de MB/BacT antes de utilizar el producto.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Es muy importante recoger, transportar, manipular y preparar correctamente las muestras para realizar un análisis preciso de los cultivos de pacientes para las especies de micobacterias que pueda haber presentes. Recoger y procesar las muestras conforme al manual *Clinical Microbiology Procedures Handbook*[10] (Manual de procedimientos de microbiología clínica) o al manual de procedimientos de laboratorio. Se recomienda la descontaminación con N-acetil-L-cisteína-hidróxido sódico para procesar muestras no estériles.

NOTA: bioMérieux recomienda que el pH final de la muestra de inóculo sea de 6,8-7,2.

PROCEDIMIENTOS

1. Antes de su uso, deben examinarse los frascos de cultivo BacT/ALERT MP en busca de signos de daños o deterioro (cambio de coloración). Los frascos que muestren signos de daños, fuga o deterioro deben desecharse. Los medios de cultivo deben estar transparentes, pero pueden formarse precipitados a temperaturas inferiores a 20 °C. No confundir la precipitación con turbidez. No utilizar frascos en los que el medio de cultivo esté turbio, el sensor esté de color amarillo o la presión de gas sea excesiva, ya que todos ellos son signos de posible contaminación.
2. Antes de su utilización, inspeccionar visualmente todos los viales de líquido para reconstitución MB/BacT en busca de signos de daños o contaminación. No debe utilizarse un vial en el que se observen grietas o fugas.
3. Antes de su utilización, inspeccionar visualmente todos los viales de suplemento antibiótico MB/BacT en busca de grietas o degradación de la pasta. No debe utilizarse un vial en el que se observen grietas o degradación.
4. Utilizar jeringas con aguja de bloqueo o con aguja con funda protectora conectada cuando no se extraiga el cierre para la inoculación.
5. Transportar siempre los frascos de cultivo inoculados en una gradilla o cesta.

Preparación del suplemento antibiótico MB/BacT

Antes de su uso, añadir por medio de una técnica aséptica 10 ml de líquido para reconstitución MB/BacT a cada vial de suplemento antibiótico MB/BacT necesario para el análisis. Dejar que se disuelva la pasta. Girar suavemente para mezclar el contenido.

NOTAS:
- Un vial de suplemento antibiótico MB/BacT reconstituido es suficiente para 20 frascos de cultivo BacT/ALERT MP.
- Una vez reconstituido, el suplemento antibiótico MB/BacT tiene un período de validez de 7 días si se conserva a 2-8 °C. Debe anotarse en la etiqueta del vial la fecha de caducidad del suplemento reconstituido.
- El líquido para reconstitución restante puede conservarse a 2-8 °C para su uso posterior con muestras estériles.

Preparación e inoculación de los frascos

NOTA: Debe procurarse evitar la contaminación durante la preparación del frasco y la inoculación de la muestra del paciente.

1. Etiquetar cada frasco de cultivo BacT/ALERT MP con la información apropiada del paciente. El usuario puede definir los iconos de la etiqueta que aparecen en la etiqueta del frasco (☺,#,◷). Los frascos deben estar equilibrados a temperatura ambiente (30-60 minutos) antes de la inoculación.
2. Desinfectar el tapón de goma con una gasa impregnada en alcohol o equivalente. Dejar secar el tapón de goma antes de añadir el suplemento antibiótico reconstituido o el líquido de reconstitución al frasco.
3. Antes de la inoculación, añadir por medio de una técnica aséptica 0,5 ml de suplemento antibiótico MB/BacT reconstituido a cada frasco de cultivo BacT/ALERT MP que se vaya a utilizar para el cultivo de muestras no estériles, o 0,5 ml de líquido para reconstitución MB/BacT a cada frasco de cultivo BacT/ALERT que se vaya a utilizar para el cultivo de muestras estériles. El líquido para reconstitución MB/BacT contiene componentes necesarios para garantizar el crecimiento óptimo de las micobacterias presentes en la muestra del paciente.
   a. Transferir por medio de una técnica aséptica el suplemento antibiótico reconstituido o el líquido para reconstitución a cada frasco de cultivo BacT/ALERT MP.
   b. Un tono rosa en el centro indicará que el suplemento o el líquido para reconstitución se han añadido satisfactoriamente.

NOTA: Los siguientes pasos deben realizarse en una cabina de seguridad biológica usando ropa protectora adecuada conforme a las normas de seguridad establecidas por los CDC/NIH para las directrices de nivel 3 de seguridad biológica[9].

Inoculación con agujas de seguridad

1. Obtener cada muestra de paciente procesada o estéril utilizando una jeringa con una aguja de bloqueo o una aguja con funda protectora conectada y transferir mediante una técnica aséptica 0,5 ml en el frasco de cultivo BacT/ALERT MP debidamente etiquetado. No se requiere ventilación. Se recomienda inocular al mismo tiempo medios de cultivo sólidos convencionales. El resto de la muestra procesada puede conservarse en condiciones de refrigeración (2-8 °C) para un uso posterior.
2. Limpiar las tapas de los frascos con una gasa impregnada en Amphyl al 2% (u otro desinfectante tuberculicida aprobado). Dejar secar antes de extraer de la cabina de seguridad biológica.
3. Verificar que se han mezclado correctamente los reactivos y la muestra en el frasco BacT/ALERT MP.

Inoculación con dispositivos sin aguja

NOTA: Debe procurarse evitar la contaminación durante la preparación del frasco y la inoculación de la muestra del paciente.

1. Si se elige el método de inoculación aséptica sin aguja, deben seguirse las instrucciones presentadas a continuación después de añadir mediante una técnica aséptica el suplemento antibiótico o el líquido para reconstitución al frasco según se describe en el prospecto del envase.
2. Quitar el precinto metálico tirando de la lengüeta central superior hacia abajo por el borde del precinto. Evitar separar completamente la lengüeta central del precinto. Continuar tirando de la lengüeta alrededor del frasco para retirar completamente el precinto del frasco.

   PRECAUCIÓN: Debe tenerse cuidado al sacar el precinto metálico de bordes plegados. Si la lengüeta se separa del precinto produciendo unos bordes afilados, no intentar sacar el precinto manualmente. En este caso, se recomienda el uso de una pinza hemostática u otro dispositivo mecánico.
3. Después de quitar el precinto metálico, retirar el tapón de goma mediante una técnica aséptica. El tapón de goma puede ser más fácil de quitar si se hace palanca a cualquiera de los lados de la hendidura del tapón.
4. Inocular la muestra en el frasco mediante una técnica aséptica utilizando un dispositivo sin aguja.
5. Volver a colocar el tapón en el frasco mediante una técnica aséptica, asegurándose de que el tapón encaje perfectamente en la abertura. Colocar un nuevo precinto (precinto BacT/ALERT®) sobre el tapón y la abertura del frasco. El precinto debe encajar sobre el borde del frasco, y la cara inferior del precinto debe quedar en contacto con la cara superior del tapón. El precinto debe encajar perfectamente en el frasco.
6. Verificar que se han mezclado correctamente los reactivos y la muestra en el frasco BacT/ALERT MP.

Procedimiento de análisis

1. Introducir los frascos de cultivo BacT/ALERT MP inoculados en el sistema MB/BacT o BacT/ALERT 3D conforme a las instrucciones provistas en el manual del usuario correspondiente.
2. Una vez cargados, los frascos de cultivo deben permanecer en el instrumento durante 42 días o hasta que se los designe como positivos.
3. Cuando el instrumento indique que un frasco es positivo, retirar el frasco conforme a los procedimientos indicados en el manual del usuario de BacT/ALERT.
4. Deben efectuarse baciloscopia y subcultivos para bacilos acidorresistentes de todos los frascos designados como positivos. Puede realizarse un subcultivo extrayendo la muestra con una aguja y una jeringa de frascos sin precinto o de frascos con precinto.
   a. **Subcultivo de frascos positivos sin precinto utilizando una aguja y una jeringa.** En una cabina de seguridad biológica, mezclar el contenido del frasco, desinfectar el tapón del frasco y extraer la muestra para tinción acidorresistente y subcultivo. Desinfectar el tapón del frasco después del subcultivo.
   b. **Subcultivo de frascos positivos con precinto.** Tirar de la lengüeta central del precinto y retirar completamente el precinto del frasco. Una vez quitado el tapón de goma mediante una técnica aséptica, puede extraerse la muestra. Si se desea guardar el frasco para nuevos análisis, volver a colocar el tapón de goma mediante una técnica aséptica y colocar un nuevo precinto sobre el tapón y el frasco.

   Si la tinción acidorresistente es positiva, realizar los procedimientos de identificación específica de micobacterias que utilice el centro. Si la baciloscopia del frotis concentrado es negativa para bacilos acidorresistentes, debe realizarse una tinción de Gram. Si la baciloscopia para bacilos acidorresistentes y la tinción de Gram son negativas, lo cual indica un posible resultado falsamente positivo, debe volver a colocarse el frasco en el instrumento hasta que se detecte crecimiento del subcultivo o hasta que sea redesignado como positivo o negativo. Los cultivos que inicialmente produjeron resultados falsamente positivos y que sean redesignados como positivos deben someterse a baciloscopia y subcultivos.
5. Si se observan microorganismos no micobacterianos en la tinción de Gram, volver a procesar todo el contenido del frasco con otro procedimiento de descontaminación e inocular en un nuevo frasco de cultivo BacT/ALERT MP, o desechar y obtener otra muestra para cultivo. Si en el nuevo frasco de cultivo BacT/ALERT MP crecen de nuevo microorganismos no micobacterianos, desechar y obtener una nueva muestra para cultivo.
6. Los cultivos de señal negativa tras el tiempo máximo de análisis deben examinarse visualmente para comprobar si existe turbidez. Si el contenido del frasco está turbio, obtener mediante una técnica aséptica una muestra para tinción acidorresistente y subcultivar conforme al protocolo del laboratorio. Los frascos que no muestren turbidez pueden desecharse. Descontaminar todos los frascos antes de desecharlos.
7. En el manual del usuario se especifican los procedimientos para cargar y extraer los frascos de cultivo en los instrumentos MB/BacT o BacT/ALERT 3D.
8. **No reutilizar los frascos de cultivo BacT/ALERT.** Desechar los frascos de cultivo BacT/ALERT inoculados conforme al protocolo del laboratorio. Los frascos BacT/ALERT inoculados pueden procesarse en autoclave o incinerarse[9].

RESULTADOS

El software de toma de decisiones instalado en los sistemas de detección de micobacterias MB/BacT o BacT/ALERT 3D clasifica los frascos de cultivo como positivos o negativos. No se requiere tomar ninguna medida hasta que el instrumento clasifique el resultado de un frasco de cultivo como positivo o negativo.

Resultados comunicados

Resultados	Informe
Señal +/baciloscopia para BAAR +	BAAR positivo; pendiente de identificación
Señal +/baciloscopia para BAAR –	Sin informe; o muestra contaminada con microorganismos no micobacterianos; no se puede determinar la presencia/ausencia de BAAR

Sólo deben comunicarse resultados preliminares después de realizar una tinción acidorresistente.

CONTROL DE CALIDAD

Con cada caja de frascos de cultivo BacT/ALERT MP se proporciona un certificado de conformidad en el que se indica el rendimiento del crecimiento satisfactorio de *M. tuberculosis* ATCC 25177 y *M. intracellulare* ATCC 13950. Tras su recepción, puede realizarse un análisis de control de calidad de los lotes o envíos nuevos de reactivos o frascos de cultivo BacT/ALERT MP. En la norma CLSI/NCCLS M22-A3 se indican los microorganismos de control de calidad adecuados. Debe seguirse el procedimiento de preparación e inoculación del frasco:

1. Añadir 0,5 ml de suplemento antibiótico MB/BacT rehidratado a cada frasco de cultivo BacT/ALERT MP necesario para el análisis.
2. Inocular frascos representativos con 0,5 ml de los microorganismos de control, diluidos a 10^4 UFC/ml en solución salina fisiológica estéril o caldo de Middlebrook 7H9 sin enriquecer estéril (lote aprobado).
3. Si se obtienen los resultados previstos, utilizar los frascos restantes para el análisis de muestras clínicas. Si no se obtienen los resultados previstos, contactar con el servicio de atención al cliente de bioMérieux.

Instrumento

Con cada instrumento se proporciona una caja de patrones de reflectancia BacT/ALERT para los procedimientos de calibración y control de calidad. Todos los controles de calidad deben formar parte del mantenimiento normal del sistema. Consultar el manual de usuario de BacT/ALERT para obtener más información.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Existen muchas variables implicadas en el análisis micobacteriano que no pueden controlarse en la práctica para proporcionar una confianza total de que los resultados obtenidos se deban exclusivamente a un rendimiento apropiado o inapropiado de un sistema de detección o de un medio de cultivo concreto.

1. Los cultivos obtenidos para diagnóstico primario después del inicio del tratamiento antimicrobiano pueden producir resultados negativos.
2. La recuperación de micobacterias en los frascos de cultivo BacT/ALERT MP depende de la calidad de la muestra recogida, del número de microorganismos cultivables presentes en el volumen de la muestra y del método de procesamiento. Para conseguir una recuperación óptima de micobacterias es esencial seguir las instrucciones del procedimiento.
3. Los microorganismos a menudo están presentes en un número bajo. Generalmente se recomienda la recogida de muestras durante tres días consecutivos.
4. Un procesamiento o descontaminación inadecuados o un retraso en el transporte de las muestras pueden causar un sobrecrecimiento de bacterias que podría dar lugar al cultivo de un caldo contaminado. Puede contaminarse todo el medio de cultivo aunque sólo haya una bacteria viable en la muestra después del procesamiento.
5. Pueden encontrarse contaminantes resistentes a los antibióticos contenidos en el suplemento antibiótico MB/BacT.
6. La morfología y la pigmentación de las colonias sólo debe determinarse en medios de cultivo sólidos.
7. Los frascos de cultivo BacT/ALERT MP con una señal positiva pueden contener una o más especies de micobacterias y otras especies no micobacterianas. En los cultivos micobacterianos mixtos en caldos, un microorganismo de crecimiento lento puede ser superado competitivamente por un microorganismo de crecimiento rápido, o puede haberse desechado el cultivo poco después de la detección del microorganismo de crecimiento rápido. La identificación de las micobacterias presentes requiere un subcultivo y procedimientos adicionales para identificar los microorganismos presentes. No se ha determinado la uniformidad de la morfología microscópica en los frascos de cultivo BacT/ALERT MP.
8. La contaminación con micobacterias saprofitas presentes en el agua corriente o en otros reactivos y equipos del laboratorio puede causar resultados "clínicamente" falsamente positivos (sin recuperación de micobacterias en la muestra clínica).
9. Se recomienda la descontaminación con el método de N-acetil-L-cisteína-hidróxido sódico. No se han probado otros métodos de descontaminación con el medio de cultivo BacT/ALERT MP. Los reactivos de digestión-descontaminación pueden tener efectos nocivos sobre las micobacterias.
10. La acidorresistencia de las micobacterias puede variar dependiendo de la cepa, la antigüedad del cultivo y otras variables. Todos los frascos con una señal positiva del instrumento BacT/ALERT MP o que parezcan turbios deben subcultivarse en medios de cultivo micobacterianos selectivos y no selectivos. Puede producirse el sobrecrecimiento de especies no micobacterianas sobre las micobacterias presentes. Estos frascos de cultivo deben descontaminarse y volver a cultivarse.
11. Los frascos de cultivo BacT/ALERT MP se incuban a 35 °C, lo cual impide la recuperación de micobacterias que requieran otras temperaturas de incubación (p. ej., *M. marinum, M. ulcerans* y *M. haemophilum*). La recuperación de estos microorganismos requiere métodos de cultivo adicionales. Es posible que no se recuperen microorganismos con requisitos de crecimiento especiales (como *M. haemophilum*) en los frascos BacT/ALERT MP si se incuban a la temperatura adecuada. En estudios analíticos se han recuperado las siguientes cepas: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* y *M. xenopi*. Se desconoce la capacidad de los frascos BacT/ALERT MP de recuperar otras cepas infrecuentes.
12. Las muestras de tejido pulverizadas son difíciles de inocular en frascos de cultivo BacT/ALERT MP con jeringas y agujas de seguridad. Para garantizar una inoculación adecuada, las muestras de tejido deben pulverizarse suficientemente para permitir la inoculación adecuada del material en los frascos BacT/ALERT MP. Además, puede ser útil usar agujas de seguridad de mayor calibre, o retirar el cierre extraíble, añadir mediante una técnica aséptica la muestra pulverizada y aplicar un precinto al frasco de cultivo BacT/ALERT MP. Si se sospecha la contaminación de muestras de tejido pulverizadas, descontaminar y procesar antes de añadir a los frascos de cultivo BacT/ALERT MP. Esto permitirá una recuperación máxima de las micobacterias que pueda haber.
13. Puede ser necesaria una incubación prolongada o la adición de Mycobactin J si se sospecha la presencia de *M. malmoense* o *M. genavense*. *M. malmoense* y *M. genavense* requieren un período de incubación ampliado superior a las pautas normales utilizadas por muchos laboratorios de Estados Unidos[2].
14. El suplemento antibiótico, aunque necesario para el análisis de la mayoría de las muestras, puede inhibir el crecimiento de algunas micobacterias.
15. Las tasas de resultados falsamente negativos en la evaluación clínica de bioMérieux fueron del 0,2%.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE LA PRUEBA

Se realizaron estudios de siembra utilizando los siguientes microorganismos a niveles de ≤ 10^6 UFC/frasco y ≤ 10^2 UFC/frasco.

Microorganismo	Inóculo (UFC/frasco)	Tiempo de detección (días)[1] BacT/ALERT MP (Plástico)
Complejo TB		
M. tuberculosis (4 cepas)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 cepas)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotocromógenas (Runyon I)		
M. kansasii (2 cepas)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Escotocromógenas (Runyon II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 cepas)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 cepas)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
No cromógenas (Runyon III)		
M. avium (4 cepas)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 cepas)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Micobacterias de crecimiento rápido (Runyon IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 cepas)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Se analizó cada microorganismo con el suplemento antibiótico MB/BacT. Se realizó un análisis para frascos únicos a ≤ 10^6 y por triplicado a ≤ 10^2. Los datos mostrados representan un intervalo de valores de varias cepas salvo en los casos de *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* y *M. chelonae*, para los que se muestran datos de microorganismos individuales.

[2] Uno de tres frascos no mostró crecimiento después de 42 días; el valor mostrado es la media de dos frascos.

[3] Un microorganismo analizado no mostró crecimiento en ninguno de los tres frascos después de 42 días.

BIBLIOGRAFÍA

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

DISPONIBILIDAD

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/caja	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 pruebas/caja	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 viales/caja	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 viales/caja	
BacT/ALERT® Reseal	100 unidades/caja	REF 259787

Para obtener asistencia técnica en Estados Unidos, póngase en contacto con el Servicio técnico de bioMérieux en el número de teléfono 1-800-682-2666. Fuera de Estados Unidos, póngase en contacto con el representante local de bioMérieux.

bioMérieux, el logotipo azul y BacT/ALERT son marcas comerciales utilizadas, en trámite y/o registradas de bioMérieux SA o una de sus filiales.

Amphyl es una marca registrada de Linden Corporation.

ATCC es una marca registrada de American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Julio de 2008

BacT/ALERT® MP

FRANÇAIS

43-03064

SECTION MISE À JOUR

Conserver entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière directe du soleil.

Se reporter au glossaire des symboles en fin de notice.

APPLICATION

Le système BacT/ALERT® MP se compose d'un flacon de culture BacT/ALERT MP muni d'un bouchon amovible, utilisé conjointement avec le supplément antibiotique MB/BacT® (et/ou la solution de reconstitution MB/BacT). Le système BacT/ALERT MP est destiné à un usage conjoint avec le système MB/BacT ou les systèmes de détection des mycobactéries BacT/ALERT® 3D pour l'isolement et la détection de mycobactéries dans des échantillons organiques stériles autres que le sang et à partir d'échantillons cliniques fluidifiés et décontaminés.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La tuberculose reste un souci mondial majeur de santé publique. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que 9 millions de nouveaux cas et 2 millions de décès sont directement attribuables à cette maladie chaque année.[1] La tuberculose est citée comme étant la première cause de mortalité dans de nombreux pays aux ressources limitées et en voie de développement.[2] Aux États-Unis, le nombre de nouveaux cas signalés au CDC a atteint sa côte maximale en 1992.[2,3] On observe depuis lors un déclin substanciel et constant des cas rapportés chaque année aux États-Unis, principalement en raison de la mise en œuvre de mesures de prévention et de contrôle de 1989 à 1993.[2] Toutefois, on continue d'observer une augmentation sensible du nombre de cas chez certaines populations, et notamment chez les individus nés en dehors des États-Unis et de ses territoires. Les infections provoquées par les organismes complexes *M. tuberculosis* sont traditionnellement d'ordre pulmonaire.

Les mycobactéries autres que le bacille de la tuberculose (MOTT) sont appelées ici mycobactéries non tuberculeuses (NTM). Sauf indication contraire, la plupart de ces isolats nécessitent une incubation entre 35 et 37 °C. Ces organismes sont le plus souvent présents dans le sol et l'eau, et ont agi en tant que pathogènes opportunistes chez des patients atteints d'une affection pulmonaire sous-jacente, d'immunosuppression ou d'un traumatisme percutané.[4] Les NTM associées aux affections pulmonaires sont : *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* et *M. xenopi* (température optimale de 42 °C). *M. marinum* et *M. ulcerans*, nécessitant une incubation à 30 °C, sont des NTM associées aux infections cutanées. Les NTM provoquant d'autres types d'infection (p. ex. maladie disséminée, lymphadénite, etc.) sont : MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* (les isolats *M. chelonae* peuvent exiger une incubation à 30 °C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* et *M. haemophilum* (exigent l'ajout d'hémine et une incubation à 30 °C).[2]

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies acido-alcoolo-résistants, ne formant pas de spores et non mobiles présentant des taux de croissance lents à très lents ; les temps de génération des espèces varient de 2 à >20 h selon l'espèce.[2] La croissance de *M. tuberculosis* en utilisant des milieux mycobactériens traditionnels prend entre deux à huit semaines, voire plus.[5] Les recommandations du CDC conseillent d'utiliser un milieu de culture liquide, ainsi qu'un milieu solide, pour la culture primaire.[6,7] La méthode par culture liquide permet d'obtenir des résultats d'antibiogramme, de croissance et de détection plus rapides pour *M. tuberculosis*.[7]

L'utilisation conjointe du système MB/BacT, des systèmes de détection des mycobactéries BacT/ALERT 3D et du système BacT/ALERT MP associe un système de détection microbienne à un milieu de culture qui offrent des conditions nutritionnelles et environnementales adéquates pour le recouvrement d'espèces de mycobactéries habituellement isolées à partir d'échantillons patient autres que le sang. Le supplément antibiotique MB/BacT a pour rôle de réduire l'incidence de la contamination résiduelle éventuelle, occasionnée par la présence d'une bactérie non éliminée par la procédure de décontamination/concentration. Il est nécessaire d'ajouter le supplément antibiotique MB/BacT aux flacons BacT/ALERT MP avant de procéder à l'inoculation de tous les échantillons non stériles. Dans le cas de l'isolement de mycobactéries présentes dans des échantillons stériles, seule la solution de reconstitution doit être ajoutée aux flacons BacT/ALERT MP. La solution de reconstitution MB/BacT contient des constituants indispensables pour assurer la croissance optimale des mycobactéries présentes dans l'échantillon patient. Les flacons inoculés sont placés dans l'instrument où ils sont incubés et suivis en continu pour y détecter la présence de mycobactéries qui se développeront dans le flacon de culture BacT/ALERT MP.

PRINCIPE DU TEST

Les systèmes de détection des mycobactéries MB/BacT et BacT/ALERT 3D répondent au même principe de détection des microorganismes dans les cultures mycobactériennes que le système de détection microbienne BacT/ALERT® en égard à l'hémoculture.[8] Les systèmes de détection des mycobactéries MB/BacT et BacT/ALERT 3D utilisent un détecteur colorimétrique et la lumière réfléchie pour suivre la présence et la production de dioxyde de carbone (CO_2) dissoute dans le milieu de culture. Si des microorganismes sont présents dans l'échantillon testé, du dioxyde de carbone est produit au fur et à mesure que les organismes métabolisent les substrats dans le milieu de culture. Lorsque la croissance des microorganismes produit du CO_2, la couleur du détecteur perméable aux gaz installé au fond de chaque flacon de culture passe au vert clair ou au jaune. La couleur plus claire entraîne une augmentation des unités de réflectance suivies par le système. La réflectance des flacons est suivie et enregistrée par l'instrument toutes les 10 minutes. Au moment de la détection, le nombre d'unités formant des colonies (UFC) par ml est d'environ 10^6-10^7.

RÉACTIFS

Pour usage diagnostique *in vitro*.

AVERTISSEMENT : Pour réduire les risques d'exposition accidentelle aux agents infectieux, des précautions supplémentaires doivent être prises en utilisant le flacon de culture BacT/ALERT MP dans le système de détection microbienne BacT/ALERT. Il est vivement recommandé de placer l'instrument dans un laboratoire pour la culture systématique de *M. tuberculosis*. Pour les activités impliquant la multiplication et la manipulation de *M. tuberculosis* ou d'espèces du genre *Mycobacterium* en culture, le recours aux pratiques de niveau 3 en matière de sécurité biologique et l'utilisation du matériel et des installations de confinement sont préconisés.[9]

BacT/ALERT® MP (code de couleur rouge) – Les flacons de culture à usage unique BacT/ALERT MP à bouchon amovible contiennent 10 ml de milieu et un détecteur de dioxyde de carbone interne qui sert d'indicateur de la croissance microbienne. Il est possible d'inoculer le flacon de culture BacT/ALERT MP au moyen d'une seringue stérile munie d'une aiguille verrouillable incorporée ou d'une aiguille gainée, ou en retirant le bouchon et en utilisant un dispositif d'inoculation sans aiguille.

La formulation du milieu est la suivante : milieu liquide Middlebrook 7H9 (0,47 % m/v), hydrolysat pancréatique de caséine (0,1 % m/v), albumine sérique bovine (1,0 % m/v), catalase (48 u/ml) dans de l'eau purifiée. Les flacons contiennent 10 ml de milieu et sont préparés en atmosphère de CO_2 dans l'azote et l'oxygène, sous vide. La composition des milieux peut être ajustée pour répondre à des exigences de performances spécifiques.

PRÉCAUTION : Les flacons de culture BacT/ALERT contiennent du polycarbonate. Certains désinfectants ne sont pas destinés à être utilisés sur des surfaces qui contiennent du polycarbonate et risquent d'entraîner la détérioration du flacon. Vérifier la compatibilité du désinfectant avec le polycarbonate avant de l'utiliser sur les surfaces des flacons de culture BacT/ALERT.

PRÉCAUTION : Il est possible que certaines mycobactéries rares et exigeantes ne se développent pas ou se développent lentement dans le milieu du flacon de culture BacT/ALERT MP. Si des mycobactéries rares et exigeantes nécessitant des conditions de culture et des milieux spécialisés sont suspectées, il faut envisager d'autres méthodes d'isolement ou prolonger la durée d'incubation.

PRÉCAUTION : Plus rarement, il est possible que des organismes se développent dans le milieu du flacon de culture BacT/ALERT MP, mais ne produisent pas suffisamment de dioxyde de carbone pour que la réaction soit déterminée positive. Par exemple, les échantillons provenant de patients sous traitement antimycobactérien peuvent présenter une croissance altérée.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

Supplément antibiotique MB/BacT® – Supplément lyophilisé dont la formule contient de l'amphotéricine B (0,0180 % m/v), de l'azlocilline (0,0034 % m/v), de l'acide nalidixique (0,0400 % m/v), de la polymyxine B (10 000 unités), du triméthoprime (0,00105 % m/v), de la vancomycine (0,0005 % m/v) et un diluant avant le traitement. La composition du supplément peut être ajustée pour répondre à des exigences de performances spécifiques. Reconstituer dans 10 ml de solution de reconstitution MB/BacT.

Solution de reconstitution MB/BacT® – Acide oléique (0,05 % m/v), glycérol (5 % m/v), amaranthe (0,004 % m/v) et albumine sérique bovine (1 % m/v) dans de l'eau purifiée. Le volume total de chaque flacon est de 15 ml. La composition de la solution de reconstitution peut être ajustée pour répondre à des exigences de performances spécifiques.

Autre matériel nécessaire

Système de détection des mycobactéries MB/BacT ou BacT/ALERT 3D
Eau distillée stérile ou désionisée
Middlebrook 7H11 ou autre milieu de culture de mycobactéries ou milieu à l'œuf
Autoclave
Poudre de N-acétyl-L-cystéine
Tampon de phosphate stérile de 0,067 M, à pH de 6,8
Centrifugeuse
Incubateur à CO_2, 37 °C
Seringues stériles munies d'une aiguille verrouillable incorporée ou d'une aiguille gainée
Pipettes stériles ou autre dispositif d'inoculation sans aiguille stérile pour les flacons dont le bouchon a été retiré
Bague de ressertissage BacT/ALERT® pour flacons à bouchon amovible
Désinfectant mycobactéricide
Tampons imbibés d'alcool
Vortex
Tubes à centrifuger coniques stériles (en polypropylène) de 50 ml
Local de sécurité biologique
Gants stériles à usage unique
Blouses à usage unique
Masques à usage unique
Microscope
Matériel pour coloration de lames
Organismes de contrôle de qualité

Matériel disponible auprès de bioMérieux

Système de détection des mycobactéries MB/BacT et systèmes de détection microbienne BacT/ALERT

Précautions d'emploi

1. ÉCHANTILLONS CLINIQUES POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Respecter les précautions universelles lors de la manipulation et de l'élimination de produits infectieux.
2. La manipulation du complexe *M. tuberculosis* en culture nécessite le recours à des pratiques de niveau 3 en matière de sécurité biologique, ainsi que du matériel et des installations de confinement.[9]
3. Tous les flacons de culture BacT/ALERT MP inoculés, les systèmes de prélèvement, les seringues, les pipettes et autres dispositifs d'inoculation sans aiguille, intervenant lors de l'inoculation, doivent être décontaminés conformément aux procédures en vigueur dans le laboratoire.[2]
4. En cas d'écoulement ou de fuite, un aérosol de mycobactéries (y compris *M. tuberculosis*) ou d'autres bactéries risque de se produire. Respecter les directives de sécurité spécifiques de l'établissement et du CDC/NIH.[9] Les désinfectants phénoliques tels que Amphyl® sont des agents de décontamination adaptés pour l'élimination des mycobactéries et d'autres microorganismes.
5. Ces flacons de culture doivent être utilisés uniquement par des techniciens de laboratoire spécialement formés.

Conservation

Les flacons de culture BacT/ALERT MP et le coffret de supplément antibiotique MB/BacT doivent être conservés réfrigérés (2 à 8 °C). Protéger de la lumière directe du soleil. Laisser reposer les flacons de culture BacT/ALERT MP à température ambiante (pendant 30 à 60 minutes) avant utilisation. Une date de péremption figure sur l'étiquette de chaque flacon. Ne pas utiliser les flacons de culture après le dernier jour du mois indiqué.

APPAREILS

Avant l'emploi, consulter le manuel d'utilisation du système de détection microbienne BacT/ALERT approprié, ainsi que le supplément au manuel d'utilisation MB/BacT.

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Il est extrêmement important d'employer une méthode de prélèvement, de transport, de manipulation et de préparation des échantillons adéquate pour déterminer avec exactitude la présence éventuelle d'espèces de mycobactéries dans les échantillons patient. Prélever et traiter les échantillons conformément au Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] ou au manuel de procédures du laboratoire. Il est recommandé d'effectuer une décontamination à l'aide de N-acétyl-L-cystéine/soude dans le cadre du traitement d'échantillons non stériles.

REMARQUE : bioMérieux recommande que le pH final de l'inoculum soit compris entre 6,8 et 7,2.

PROCÉDURES

1. Avant l'emploi, vérifier l'absence de dégâts ou de signes de détérioration des flacons de culture BacT/ALERT MP (décoloration). Les flacons montrant des traces de dommage, de fuite ou de détérioration doivent être mis au rebut. Le milieu doit être transparent, mais un précipité peut se former à des températures inférieures à 20 °C. Ne pas confondre précipitation et trouble. Ne pas utiliser de flacon contenant un milieu présentant un trouble, un détecteur jaune ou une pression gazeuse excessive, car cela témoigne d'une possible contamination.
2. Avant l'emploi, vérifier l'absence de dégâts ou de signes de contamination de tous les flacons de solution de reconstitution MB/BacT. Un flacon présentant des fissures ou une fuite ne doit pas être utilisé.
3. Avant l'emploi, inspecter visuellement tous les flacons de complément antibiotique MB/BacT pour déceler des fissures ou une dégradation du tourteau. Le flacon ne doit pas être utilisé si des fissures ou une dégradation est observée.
4. Utiliser des seringues à aiguille verrouillable ou des seringues à aiguille gainée incorporée lorsque le bouchon du flacon reste en place durant l'inoculation.
5. Toujours transporter les flacons inoculés dans un bloc ou dans un panier.

Préparation du supplément antibiotique MB/BacT

Avant l'emploi, ajouter stérilement 10 ml de solution de reconstitution MB/BacT à chaque flacon de supplément antibiotique MB/BacT nécessaire pour le test. Permettre au tourteau de se dissoudre. Agiter délicatement pour mélanger le contenu.

REMARQUES :

- Un flacon de supplément antibiotique MB/BacT reconstitué est suffisant pour la préparation de 20 flacons de culture BacT/ALERT MP.
- Une fois reconstitué, le supplément antibiotique MB/BacT a une durée de conservation de 7 jours à une température de 2 à 8 °C. La date d'expiration du supplément reconstitué doit être enregistrée sur l'étiquette du flacon.
- La solution de reconstitution restante peut être conservée entre 2 et 8 °C pour un usage ultérieur avec des échantillons stériles.

Préparation et inoculation des flacons

REMARQUE : Prendre soin de ne pas contaminer l'échantillon patient lors de la préparation et l'inoculation des flacons.

1. Reporter les informations patient appropriées sur l'étiquette de chaque flacon de culture BacT/ALERT MP. Les icônes de l'étiquette du flacon (☺,#,☹) peuvent être définies par l'utilisateur. Laisser reposer les flacons à température ambiante (pendant 30 à 60 minutes) avant de procéder à l'inoculation.
2. Désinfecter le bouchon avec un tampon imbibé d'alcool ou équivalent. Laisser sécher le bouchon avant d'ajouter au flacon le supplément antibiotique reconstitué ou la solution de reconstitution.
3. Avant l'inoculation, ajouter stérilement 0,5 ml de supplément antibiotique MB/BacT reconstitué à chaque flacon de culture BacT/ALERT MP destiné à la culture d'échantillons non stériles, ou 0,5 ml de solution de reconstitution MB/BacT à chaque flacon de culture BacT/ALERT destiné à la culture d'échantillons stériles. La solution de reconstitution MB/BacT contient des constituants indispensables pour assurer la croissance optimale des mycobactéries présentes dans les échantillons patient.
   a. Transférer stérilement dans chaque flacon de culture BacT/ALERT MP le supplément antibiotique reconstitué ou la solution de reconstitution.
   b. Le virage au rose du milieu indique que le supplément ou la solution de reconstitution a été ajouté avec succès.

REMARQUE : Il est impératif d'effectuer les étapes suivantes dans un local de sécurité biologique et de porter des vêtements de protection appropriés, conformément aux normes de sécurité préconisées par le CDC/NIH concernant les directives de niveau 3 en matière de sécurité biologique.[9]

Inoculation au moyen d'aiguilles de sécurité

1. Prélever chaque échantillon patient traité ou stérile au moyen d'une seringue munie d'une aiguille verrouillable incorporée ou d'une aiguille gainée et transférer stérilement 0,5 ml dans le flacon de culture BacT/ALERT MP convenablement étiqueté. Aucune ventilation n'est nécessaire. Il est recommandé de procéder à l'inoculation en parallèle de milieux solides conventionnels. Le reste de l'échantillon traité peut être conservé réfrigéré (entre 2 et 8 °C) pour usage ultérieur.
2. Tamponner le dessus des flacons avec de la gaze imbibée d'Amphyl à 2 % (ou d'un autre désinfectant tuberculocide agréé). Laisser sécher avant de les retirer du local de sécurité biologique.
3. Veiller à bien mélanger les réactifs et l'échantillon dans le flacon BacT/ALERT MP.

Inoculation au moyen de dispositifs sans aiguille

REMARQUE : Prendre soin de ne pas contaminer l'échantillon patient lors de la préparation et de l'inoculation des flacons.

1. Si l'on opte pour la méthode d'inoculation sans aiguille, suivre les instructions indiquées ci-dessous après avoir ajouté stérilement au flacon le supplément antibiotique ou la solution de reconstitution conformément à la notice d'emploi.
2. Retirer la bague de sertissage métallique en soulevant la patte centrale et en la tirant en travers et vers le bas par-dessus le bord de la bague de sertissage. Éviter de déchirer complètement la patte centrale de la bague de sertissage. Continuer à tirer la patte dans un mouvement circulaire autour du flacon pour séparer complètement la bague de sertissage du flacon.

   PRÉCAUTION : Retirer la bague de sertissage métallique avec soin. Si la patte se détache de la bague de sertissage en formant des bords tranchants, ne pas tenter de retirer la bague de sertissage à la main. L'utilisation d'une pince hémostatique ou d'un autre dispositif mécanique est recommandée.
3. Après avoir retiré la bague de sertissage métallique, ôter stérilement le septum. Il peut être plus facile de le retirer en le saisissant de part et d'autre de la fente du septum pour le dégager du flacon.
4. Inoculer stérilement l'échantillon dans le flacon au moyen d'un dispositif sans aiguille.
5. Remettre en place stérilement le septum dans le flacon, en vérifiant qu'il est engagé à fond. Placer une bague de ressertissage (type BacT/ALERT®) au-dessus du septum et de l'ouverture du flacon. La bague de ressertissage doit s'encliqueter sous la bague du goulot et le dessous de la bague doit être entièrement en contact avec le dessus du septum. La bague de ressertissage doit s'adapter étroitement au flacon.
6. Veiller à bien mélanger les réactifs et l'échantillon dans le flacon BacT/ALERT MP.

Procédure de test

1. Introduire les flacons de culture BacT/ALERT MP inoculés dans le système MB/BacT ou l'instrument BacT/ALERT 3D, selon les consignes fournies dans le manuel d'utilisation approprié.
2. Les flacons de culture doivent rester chargés dans l'instrument pendant 42 jours ou jusqu'à ce qu'ils aient été déterminés positifs.
3. Lorsque l'instrument désigne un flacon positif, retirer celui-ci conformément aux procédures indiquées dans le manuel d'utilisation de l'instrument BacT/ALERT.
4. Étaler et repiquer tous les flacons déterminés positifs pour la détection de bacilles acido-alcoolo-résistants. Le repiquage peut s'effectuer en prélevant l'échantillon à partir de flacons dépourvus de bague de ressertissage, au moyen d'une aiguille et d'une seringue, ou à partir de flacons munis d'une bague de ressertissage.
   a. **Repiquage à partir de flacons positifs dépourvus de bague de ressertissage, au moyen d'une aiguille et d'une seringue.** Dans un local de sécurité biologique, mélanger le contenu du flacon, désinfecter le bouchon du flacon, puis prélever l'échantillon destiné à la coloration acido-alcoolo-résistante et au repiquage. Après le repiquage, désinfecter le bouchon du flacon.
   b. **Repiquage à partir de flacons positifs munis d'une bague de ressertissage.** Détacher la patte centrale de la bague de ressertissage et la tirer pour séparer complètement la bague du flacon. Une fois le septum ôté stérilement, l'échantillon peut être prélevé. Si l'on souhaite conserver le flacon pour d'autres tests, il convient de replacer stérilement le bouchon et de poser une nouvelle bague de ressertissage sur le bouchon du flacon.

   Si l'étalement acido-alcoolo-résistant se révèle positif, passer aux procédures spécifiques d'identification des mycobactéries mises en œuvre par le laboratoire. Si l'étalement concentré se révèle négatif pour les bacilles acido-alcoolo-résistants, il est nécessaire d'effectuer une coloration de Gram. Si l'étalement acido-alcoolo-résistant et la coloration de Gram sont tous deux négatifs, ce qui indique la possibilité d'un faux positif, recharger le flacon dans l'instrument jusqu'à l'obtention d'une croissance du repiquage ou un reclassement déterminé positif ou négatif. Étaler et repiquer les cultures initialement déterminées fausses positives puis reclassées positives.

5. Si des organismes non-mycobactériens sont visibles sur la coloration de Gram, faire subir au contenu du flacon une nouvelle procédure de décontamination et l'inoculer dans un nouveau flacon de culture BacT/ALERT MP, ou l'éliminer et prélever un autre échantillon pour la culture. Si le nouveau flacon de culture BacT/ALERT MP montre de nouveau une croissance des organismes non-mycobactériens, le mettre au rebut et obtenir un nouvel échantillon de culture.
6. Les cultures signalées négatives pendant la durée maximale de test doivent être visuellement examinées pour contrôler leur trouble. Si le contenu du flacon est trouble, prélever stérilement un échantillon à des fins de coloration acido-alcoolo-résistante et de repiquage conformément au protocole en vigueur dans le laboratoire. Les flacons ne présentant aucun trouble peuvent être éliminés. Décontaminer tous les flacons avant élimination.
7. Les procédures de chargement et de déchargement des flacons de culture dans le système MB/BacT ou l'instrument BacT/ALERT 3D sont décrites dans le manuel d'utilisation.
8. **Ne pas réutiliser les flacons de culture BacT/ALERT.** Éliminer les flacons de culture BacT/ALERT inoculés conformément au protocole du laboratoire. L'autoclavage et/ou l'incinération des flacons BacT/ALERT inoculés est adéquat.[9]

RÉSULTATS

La positivité ou négativité des flacons de culture est déterminée par un logiciel de prise de décision résidant dans le système MB/BacT ou les systèmes de détection des mycobactéries BacT/ALERT 3D. Aucune intervention n'est requise jusqu'à ce que l'instrument signale des flacons de culture positifs ou négatifs.

Rapports des résultats

Résultats	Rapport
Signal +, étalement AFB +	AFB positif ; en instance d'identification
Signal +, étalement AFB -	Pas de rapport ; ou échantillon contaminé par des organismes non-mycobactériens ; impossible de déterminer la présence/absence d'AFB

N'indiquer les résultats préliminaires qu'une fois la coloration acido-alcoolo-résistante effectuée.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un Certificat de conformité est fourni avec chaque boîte de flacons de culture BacT/ALERT MP indiquant une croissance satisfaisante de *M. tuberculosis* ATCC 25177 et de *M. intracellulare* ATCC 13950. Dès réception, un contrôle de qualité des nouveaux lots de réactifs ou de flacons de culture BacT/ALERT MP peut être effectué. Se reporter au document M22-A3 du CLSI/NCCLS pour connaître les organismes de contrôle de qualité appropriés. Suivre la procédure d'inoculation et de préparation des flacons :

1. Ajouter 0,5 ml de supplément antibiotique réhydraté MB/BacT à chaque flacon de culture BacT/ALERT MP nécessaire pour le test.
2. Inoculer dans les flacons représentatifs 0,5 ml des organismes de contrôle, dilués à 10^4 UFC/ml dans une solution saline stérile ou un milieu liquide Middlebrook 7H9 (lot approuvé) stérile sans supplément.
3. Si les résultats obtenus correspondent aux résultats attendus, utiliser les flacons restants pour tester les échantillons cliniques. Si les résultats obtenus diffèrent des résultats attendus, contacter le service client de bioMérieux.

Instrument

Un coffret d'étalons de réflectance BacT/ALERT est fourni avec chaque instrument pour les procédures de CQ et d'étalonnage. Tout contrôle de qualité doit s'inscrire dans le cadre d'une maintenance normale du système. Consulter le manuel d'utilisation de l'instrument BacT/ALERT pour plus d'informations.

LIMITES DU TEST

En pratique, les nombreux paramètres intervenant dans le dépistage des mycobactéries ne permettent pas d'affirmer avec certitude que les résultats obtenus sont dus uniquement aux qualités propres d'un milieu de culture ou d'un système de détection.

1. Les cultures obtenues dans le cadre d'un diagnostic primaire faisant suite à un traitement antimicrobien récemment débuté peuvent produire des résultats négatifs.
2. L'isolement des mycobactéries dans les flacons BacT/ALERT MP est fonction de la qualité de l'échantillon prélevé, du nombre d'organismes cultivables présents dans le volume d'échantillon et de la méthode de traitement appliquée. L'observation des consignes de procédures est cruciale pour réaliser un isolement optimal des mycobactéries.
3. Les organismes sont souvent très peu nombreux. Il est généralement recommandé de prélever des échantillons sur une période de trois jours consécutifs.
4. Le traitement ou une décontamination incorrect ou le transport différé des échantillons peut avoir pour conséquence une prolifération bactérienne susceptible de contaminer un milieu de culture liquide. La présence d'une seule bactérie viable dans l'échantillon après le traitement suffit à contaminer le milieu de culture entier.
5. Des contaminants résistants aux antibiotiques contenus dans le supplément antibiotique MB/BacT peuvent être présents.
6. La morphologie et la pigmentation des colonies ne doivent être déterminées que sur milieu solide.
7. Les flacons de culture BacT/ALERT MP signalés positifs peuvent contenir une ou plusieurs espèces de mycobactéries et/ou d'autres espèces non-mycobactériennes. Dans les cultures mixtes de mycobactéries en milieu liquide, un microorganisme à croissance lente peut être devancé par un microorganisme à croissance rapide ou la culture peut être mise au rebut dès que le microorganisme à croissance rapide est détecté. L'identification des mycobactéries présentes nécessite un repiquage ainsi que la mise en œuvre de procédures supplémentaires d'identification des organismes présents. La constance de la morphologie microscopique dans les flacons de culture BacT/ALERT MP n'a pas été établie.
8. La contamination par des mycobactéries saprophytes présentes dans l'eau du robinet ou tout autre réactif et équipement de laboratoire peut produire des résultats « cliniquement » faux positifs (isolement de mycobactéries non issues de l'échantillon clinique).
9. Une décontamination par la méthode N-acétyl-L-cysténe-hydroxyde de sodium est recommandée. D'autres méthodes de décontamination n'ont pas été testées conjointement avec le milieu de culture BacT/ALERT MP. Les réactifs de décontamination-digestion peuvent avoir un effet néfaste sur les mycobactéries.
10. Les mycobactéries peuvent avoir une acido-alcoolo-résistance différente selon la souche, l'âge de la culture et d'autres paramètres. Il convient de repiquer tous les flacons BacT/ALERT MP signalés positifs ou présentant un trouble dans des milieux mycobactériens sélectifs et non sélectifs. Les espèces non-mycobactériennes peuvent se multiplier plus rapidement que les mycobactéries présentes. Décontaminer et repiquer de tels flacons de culture.
11. Les flacons de culture BacT/ALERT MP sont incubés à 35 °C ce qui empêche l'isolement des mycobactéries exigeant d'autres températures d'incubation (p. ex. *M. marinum, M. ulcerans* et *M. haemophilum*). Pour isoler de tels organismes, il est nécessaire de faire appel à d'autres méthodes de culture. Il est possible que des organismes nécessitant des conditions de croissance particulières (p. ex., *M. haemophilum*) ne soient pas isolés dans des flacons BacT/ALERT MP, même s'ils sont incubés à la température appropriée. Les isolats suivants ont été obtenus dans le cadre d'études analytiques : *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* et *M. xenopi*. La capacité des flacons BacT/ALERT MP à isoler d'autres isolats rares est inconnue.
12. Il est difficile d'inoculer des échantillons tissulaires broyés dans des flacons de culture BacT/ALERT MP au moyen d'aiguilles et de seringues de sécurité. Afin d'assurer une inoculation appropriée, les échantillons tissulaires doivent être broyés suffisamment finement pour permettre une inoculation adéquate de l'échantillon dans les flacons BacT/ALERT MP. En outre, il peut être préférable d'utiliser des aiguilles de sécurité de diamètre plus important ou de retirer le bouchon amovible du flacon, d'ajouter stérilement l'échantillon broyé et de placer une bague de ressertissage sur le flacon de culture BacT/ALERT MP. Si une contamination des échantillons tissulaires broyés est suspectée, décontaminer et traiter avant d'ajouter aux flacons BacT/ALERT MP. Ceci permet d'optimiser l'isolement des mycobactéries éventuellement présentes.
13. L'incubation prolongée ou l'ajout de Mycobactine J peut s'avérer nécessaire si *M. malmoense* ou *M. genavense* est suspecté. *M. malmoense* et *M. genavense* sont connus pour leur durée d'incubation particulièrement longue, dépassant les périodes d'incubation normales utilisées par la plupart des laboratoires américains.[2]
14. Bien que nécessaire pour tester la plupart des échantillons, le supplément antibiotique peut inhiber la croissance de certaines mycobactéries.
15. Les taux de faux négatifs résultant de l'évaluation clinique de bioMérieux étaient de 0,2 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES DU TEST

Des études d'ensemencement ont été effectuées avec les organismes suivants à des concentrations ≤ 10^6 UFC/flacon et ≤ 10^2 UFC/flacon.

Microorganisme	Inoculum (UFC/ flacon)	Temps de détection (en jours)[1] BacT/ALERT MP (Plastique)
Complexe TB		
M. tuberculosis (4 souches)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 souches)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Photochromogènes (Runyoun I)		
M. kansasii (2 souches)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Scotochromogènes (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 souches)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 souches)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Nonchromogènes (Runyoun III)		
M. avium (4 souches)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 souches)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Bactéries à croissance rapide (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 souches)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Chaque organisme a été testé à l'aide du supplément antibiotique MB/BacT. L'ensemble des tests a été réalisé sur des flacons individuels à une concentration ≤ 10^6 et en triple à ≤ 10^2. Les données indiquées représentent une plage de valeurs correspondant à plusieurs souches, sauf pour *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* et *M. chelonae* pour lesquels des données sont fournies pour chaque organisme.
[2] L'un des trois flacons n'a présenté aucune croissance au bout de 42 jours ; la valeur indiquée est la moyenne des valeurs des deux autres flacons.
[3] L'un des organismes testés n'a indiqué aucune croissance dans les trois flacons au bout de 42 jours.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

AVAILABILITY DISPONIBILITÉ

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100 par boîte	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	Coffret pour 100 tests	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 flacons par coffret	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 flacons par coffret	
BacT/ALERT® Reseal	100 unités par boîte	REF 259787

Pour toute assistance technique aux États-Unis, contacter le service clientèle de bioMérieux au +1 800 682 2666. Pour les autres pays, contacter un représentant local de bioMérieux.

bioMérieux, le logo bleu et BacT/ALERT sont des marques de commerce utilisées, en attente d'homologation et/ou déposées de bioMérieux SA ou de l'une de ses filiales.

Amphyl est une marque déposée de Linden Corporation.

ATCC est une marque déposée de American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Juillet 2008

BacT/ALERT® MP

ITALIANO

43-03064

INDICA SEZIONE RIVISTA

Conservare a 2-8°C, al riparo dalla luce solare diretta.

Consultare il glossario dei simboli alla fine della scheda tecnica.

USO PREVISTO

Il sistema BacT/ALERT® MP consiste in un flacone BacT/ALERT MP con chiusura rimovibile, usato in combinazione con il supplemento antibiotico MB/BacT® (e/o il fluido di ricostituzione MB/BacT). BacT/ALERT MP viene utilizzato con i sistemi di rilevazione micobatterica MB/BacT o BacT/ALERT® 3D per il recupero e la rilevazione di micobatteri in campioni organici sterili non ematici e campioni clinici decontaminati.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La tubercolosi continua a rappresentare un grande problema di salute pubblica mondiale. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ogni anno si contano 9 milioni di nuovi casi e 2 milioni di morti sono direttamente imputabili alla malattia.[1] La tubercolosi è stata indicata come principale causa di morte in numerosi paesi poveri di risorse e in via di sviluppo.[2] Negli Stati Uniti, il numero di nuovi casi riportato dal CDC ha raggiunto il massimo nel 1992[2,3]; dopo tale data, grazie all'adozione di misure di prevenzione e controllo nel periodo compreso tra il 1989 e il 1993, si è assistito ad un calo marcato e costante di nuovi casi.[2] Tuttavia, si continua a registrare un aumento significativo nel numero di casi all'interno di alcuni gruppi di popolazione, soprattutto tra le persone nate fuori dagli Stati Uniti e dai territori statunitensi. Le infezioni causate dai microrganismi del complesso *M. tuberculosis* sono normalmente polmonari.

I micobatteri diversi dal bacillo tubercolare (MOTT) sono qui definiti micobatteri non tubercolari (NTM). La maggior parte di questi isolati richiede l'incubazione a 35 - 37°C, salvo altrimenti specificato. Questi microrganismi si trovano di norma nel suolo e nell'acqua e si ritiene che svolgano un ruolo di patogeni opportunisti in pazienti con patologie polmonari pre-esistenti, immunosoppressione o trauma percutaneo.[4] Gli NTM associati ad affezioni polmonari sono: *complesso M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, complesso *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. shimoidei*, *M. celatum*, e *M. xenopi* (temperatura ottimale di 42°C). *M. marinum* e *M. ulcerans*, che richiedono incubazione a 30°C, sono NTM associati a infezioni cutanee. Gli NTM che generano altri tipi di infezione (es. malattia disseminata, linfadenite, ecc.) sono: MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, complesso *M. fortuitum* (gli isolati di *M. chelonae* possono richiedere un'incubazione a 30°C), *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. celatum* e *M. haemophilum* (richiedono l'aggiunta di emina e incubazione a 30°C).[2]

I micobatteri sono bacilli aerobi, non sporigeni, non motili, acido-resistenti, caratterizzati da velocità di crescita basse o molto basse; i tempi di replicazione variano da 2 a >20 ore a seconda delle specie.[2] La crescita di *M. tuberculosis* in terreni tradizionali per micobatteri può richiedere due - otto settimane o periodi più lunghi.[5] Le raccomandazioni del CDC suggeriscono di usare un terreno di coltura liquido, unitamente a terreni solidi, per la coltura primaria.[6,7] Il metodo di coltura liquida è necessario per ottenere tempi di rilevazione, di crescita e risultati di antibiogramma più rapidi per *M. tuberculosis*.[7]

I sistemi di rilevazione micobatterica MB/BacT e BacT/ALERT 3D, usati insieme al sistema BacT/ALERT MP, offrono un mezzo di rilevazione microbica e un terreno di coltura con condizioni ambientali e nutrizionali adatte a recuperare le specie di micobatteri normalmente isolate da campioni non ematici. Il supplemento antibiotico MB/BacT serve a ridurre l'incidenza di contaminazione dovuta all'eventuale sopravvivenza di alcuni batteri al processo di decontaminazione/concentrazione. Il supplemento antibiotico MB/BacT deve essere aggiunto ai flaconi BacT/ALERT MP prima dell'inoculo di tutti i campioni non sterili, mentre per il recupero di campioni sterili è necessario aggiungere al flacone il solo fluido di ricostituzione. Il fluido di ricostituzione MB/BacT contiene componenti necessari a garantire la crescita ottimale dei micobatteri presenti nel campione. I flaconi BacT/ALERT MP inoculati vengono incubati nello strumento, dove sono sottoposti a monitoraggio continuo ai fini della rilevazione della crescita di micobatteri.

PRINCIPIO DEL TEST

Il principio adottato dai sistemi di rilevazione micobatterica MB/BacT e BacT/ALERT 3D per rilevare questi microrganismi nelle colture di micobatteri è identico a quello impiegato dal sistema di rilevazione microbica BacT/ALERT® per le emocolture.[8] I sistemi di rilevazione micobatterica MB/BacT e BacT/ALERT 3D utilizzano un sensore colorimetrico e luce riflessa per monitorare la presenza e la produzione di anidride carbonica (CO_2) nel terreno di coltura. I microrganismi eventualmente presenti nel campione metabolizzano i substrati nel terreno di coltura producendo anidride carbonica. La produzione di CO_2, determinata dalla crescita dei microrganismi, fa sì che il colore del sensore gaspermeabile presente sul fondo di ogni flacone di coltura viri a un verde più chiaro o al giallo. La colorazione più chiara determina un aumento delle unità di riflettanza monitorate dal sistema. La riflettanza del flacone viene monitorata e registrata dallo strumento ogni 10 minuti. Al momento della rilevazione di un positivo, il numero approssimativo di unità formanti colonie (UFC) per ml è di 10^6-10^7.

REAGENTI

Per uso diagnostico *in vitro*.

AVVERTENZA: per ridurre il rischio di esposizione accidentale agli agenti infettivi, adottare precauzioni aggiuntive durante l'utilizzo del flacone BacT/ALERT MP con il sistema di rilevazione microbica BacT/ALERT. Si consiglia vivamente di posizionare lo strumento in un laboratorio usato per la coltura di routine di *M. tuberculosis*. Per attività che comprendono la manipolazione ed il rischio di diffusione dei *M. tuberculosis* o *Mycobacterium sp.* cresciuti in coltura, sono necessarie infrastrutture, apparecchiature di contenimento e procedure di biosicurezza livello 3.[9]

BacT/ALERT® MP (codice colore: rosso) – I flaconi di coltura monouso BacT/ALERT MP, con chiusura rimovibile, contengono 10 ml di terreno e un sensore interno che rileva l'anidride carbonica come indicatore di crescita microbica. Ciascun flacone BacT/ALERT MP può essere inoculato mediante una siringa sterile fornita di ago con chiusura di sicurezza o protetto da guaina oppure rimuovendo la chiusura e usando un dispositivo di inoculo senza ago.

La formulazione del terreno è costituita da: brodo Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), digerito pancreatico di caseina (0,1% p/v), sieroalbumina bovina (1,0% p/v), catalasi (48 u/ml) in acqua purificata. I flaconi contengono 10 ml di terreno e sono preparati con un'atmosfera di CO_2, azoto e ossigeno sotto vuoto. La composizione del terreno può essere corretta ed adeguata alle performance specifiche richieste.

ATTENZIONE: i flaconi BacT/ALERT contengono policarbonato. Non tutti i disinfettanti sono adatti all'uso con superfici in policarbonato e potrebbero causare un deterioramento del flacone. Verificare la compatibilità del disinfettante con il policarbonato prima di utilizzarlo sui flaconi BacT/ALERT.

ATTENZIONE: è possibile che alcuni rari micobatteri con particolari esigenze non crescano o crescano lentamente nel flacone BacT/ALERT MP. Qualora si sospetti la presenza di questi microrganismi che richiedono condizioni e terreni specifici, è necessario considerare l'uso di metodi alternativi di recupero o un tempo di incubazione più lungo.

ATTENZIONE: raramente, è possibile riscontrare microrganismi che crescono nei flaconi BacT/ALERT MP, senza produrre una quantità di anidride carbonica sufficiente a determinare una positività. Per esempio, i campioni di pazienti trattati con agenti antimicobatterici possono evidenziare una crescita minore.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Supplemento liofilizzato formulato per contenere anfotericina B (0,0180% p/v), azlocillina (0,0034% p/v), acido nalidixico (0,0400% p/v), polimixina B (10.000 unità), trimetoprim (0,00105% p/v), vancomicina (0,0005% p/v) e un agente volumizzante. La composizione del supplemento può essere corretta e adeguata alle performance specifiche richieste. Ricostituire con 10 ml di fluido di ricostituzione MB/BacT.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Acido oleico (0,05% p/v), glicerolo (5% p/v), amaranto (0,004% p/v) e sieroalbumina bovina (1% p/v) in acqua purificata. Ciascun flacone ha un volume totale di riempimento di 15 ml. La composizione del fluido di ricostituzione può essere corretta e adeguata alle performance specifiche richieste.

Altri materiali necessari

Sistema di rilevazione micobatterica MB/BacT o BacT/ALERT 3D
Acqua deionizzata o distillata sterile
Brodo Middlebrook 7H11 o un altro terreno a base d'uovo o agar per micobatteri
Autoclave
Polvere N-acetil-L-cisteina
Tampone fosfato sterile 0,067 M, pH 6,8
Centrifuga
Termostato CO_2, 37°C
Siringhe sterili con aghi con chiusura di sicurezza o aghi protetti da guaina
Pipette sterili o altri dispositivi di inoculo sterili senza ago, per i flaconi con chiusure rimovibili
Capsula sigillante BacT/ALERT® Reseal per il sistema con chiusura rimovibile
Disinfettante micobattericida
Tamponi imbevuti di alcol
Miscelatore vortex
Provette coniche sterili in polipropilene, per centrifuga, da 50 ml
Cappa di sicurezza biologica
Guanti sterili monouso
Camici monouso
Maschere monouso
Microscopio
Materiali per la colorazione dei vetrini
Ceppi per il Controllo di Qualità:

Materiali acquistabili da bioMérieux

Sistema di rilevazione micobatterica MB/BacT e sistema di rilevazione microbica BacT/ALERT

Precauzioni

1. CAMPIONE POTENZIALMENTE INFETTIVO. Osservare le precauzioni universalmente adottate per la manipolazione e l'eliminazione di materiali infettivi.
2. Lavorando con microrganismi del complesso *M. tuberculosis* cresciuti in coltura, il laboratorio deve essere conforme alle norme del livello di biosicurezza 3 e disporre di infrastrutture e sistemi di contenimento appropriati.[9]
3. Tutti i flaconi BacT/ALERT MP inoculati, i dispositivi di prelievo dei campioni, le siringhe, le pipette o gli altri sistemi di inoculo privi di ago utilizzati per l'inoculo, devono essere decontaminati in conformità alle procedure del laboratorio.[2]
4. Eventuali perdite possono dare luogo ad un aerosol di micobatteri (incluso *M. tuberculosis*) o altri batteri. Seguire le linee guida specifiche del laboratorio e del CDC/NIH.[9] I disinfettanti fenolici come l'Amphyl® sono agenti idonei per la decontaminazione di micobatteri e altri microrganismi.
5. Questi flaconi di coltura devono essere utilizzati esclusivamente da personale di laboratorio addestrato.

Istruzioni per la conservazione

Conservare i flaconi BacT/ALERT MP e il kit supplemento antibiotico MB/BacT in frigorifero (2-8°C). Tenere al riparo dalla luce diretta del sole. Prima dell'uso, attendere che i flaconi BacT/ALERT MP raggiungano la temperatura ambiente (30-60 minuti). Sull'etichetta di ogni flacone è stampata la data di scadenza. Non usare i flaconi oltre l'ultimo giorno del mese indicato.

STRUMENTI

Prima dell'uso, leggere il manuale d'uso relativo al sistema BacT/ALERT utilizzato e il capitolo "Test per micobatteri" del manuale d'uso MB/BacT.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La correttezza delle procedure di prelievo dei campioni, trasporto, manipolazione e preparazione è essenziale ai fini dell'accuratezza dell'analisi delle colture delle specie di micobatteri eventualmente presenti. Prelevare e trattare i campioni in conformità al Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] oppure alle linee guida stabilite dal manuale di procedura del laboratorio. In caso di trattamento di campioni non sterili, si raccomanda la decontaminazione con N-acetil-L-cisteina-idrossido di sodio.

NOTA: bioMérieux raccomanda che il pH finale del campione da inoculare sia tra 6,8 e 7,2.

PROCEDURE

1. Prima dell'uso, verificare se i flaconi BacT/ALERT MP presentano segni di danni o deterioramento (alterazione del colore). Scartare i flaconi che presentano segni di danneggiamento, perdite o deterioramento. Il terreno deve essere trasparente, sebbene a temperature inferiori a 20°C possano formarsi precipitati. Non confondere la precipitazione con la torbidità. Non usare i flaconi nel caso in cui presentino terreni torbidi, eccessiva pressione di gas o un sensore di colore giallo, in quanto questi sono segni di eventuale contaminazione.
2. Prima dell'uso, controllare visivamente se i flaconi del fluido di ricostituzione MB/BacT sono incrinati o contaminati. Non usare un flacone se si riscontrano segni di incrinature o perdite.
3. Prima dell'uso, controllare visivamente se i flaconi del supplemento antibiotico MB/BacT sono incrinati o se la compressa è alterata. Non usare un flacone se si riscontrano segni di incrinature o alterazione.
4. Qualora per l'inoculo non si rimuova la chiusura, usare siringhe con aghi con chiusura di sicurezza o protetti da guaina.
5. Trasportare sempre i flaconi inoculati in un apposito rack o cestello.

Preparazione del supplemento antibiotico MB/BacT

Prima dell'uso, versare asetticamente 10 ml di fluido di ricostituzione MB/BacT in ciascun flacone di supplemento antibiotico MB/BacT richiesto per il test. Attendere che la compressa si sciolga. Roteare delicatamente per miscelare il contenuto.

NOTE:
- Un flacone di supplemento antibiotico MB/BacT ricostituito è sufficiente per 20 flaconi BacT/ALERT MP.
- Una volta ricostituito, il supplemento antibiotico MB/BacT ha una durata utile di 7 giorni, a condizione che sia conservato a 2-8°C. La data di scadenza del supplemento ricostituito dovrebbe essere registrata sull'etichetta del flacone.
- Il fluido di ricostituzione rimanente può essere conservato a 2-8°C per essere usato in un secondo momento con i campioni sterili.

Preparazione e inoculo dei flaconi

NOTA: prestare attenzione a evitare la contaminazione durante la preparazione del flacone e l'inoculo del campione.

1. Apporre a ogni flacone BacT/ALERT MP un'etichetta recante le informazioni sul paziente. Le icone sull'etichetta del flacone (☺,#,◷) possono essere definite dall'utente. Prima dell'inoculo, attendere che i flaconi raggiungano la temperatura ambiente (30-60 minuti).
2. Disinfettare il tappo con un tampone imbevuto di alcol o sostanza equivalente. Attendere che il tappo si asciughi prima di aggiungere al flacone il supplemento antibiotico ricostituito o il fluido di ricostituzione.
3. Prima dell'inoculo, aggiungere asetticamente 0,5 ml di supplemento antibiotico MB/BacT ricostituito in ogni flacone BacT/ALERT MP da usare per la coltura di campioni non sterili, oppure 0,5 ml del solo fluido di ricostituzione MB/BacT in ogni flacone BacT/ALERT da usare per la coltura di campioni sterili. Il fluido di ricostituzione MB/BacT contiene i componenti necessari a garantire la crescita ottimale dei micobatteri presenti nei campioni.
   a. Trasferire asetticamente il supplemento antibiotico ricostituito o il fluido di ricostituzione in ogni flacone BacT/ALERT MP.
   b. La colorazione rosa del terreno indica che il supplemento o il fluido di ricostituzione è stato aggiunto correttamente.

NOTA: eseguire le operazioni seguenti sotto cappa di sicurezza biologica, indossando indumenti protettivi appropriati in conformità alle norme di sicurezza stabilite da CDC/NIH per le linee guida del livello di biosicurezza 3.[9]

Inoculo con aghi dotati di sistema di sicurezza

1. Prelevare ogni campione trattato o sterile usando una siringa con ago dotato di chiusura di sicurezza o protetto da guaina e trasferire asetticamente 0,5 ml nel flacone BacT/ALERT MP recante l'etichetta appropriata. Non è necessaria l'aerazione dei flaconi. Si raccomanda di inoculare contemporaneamente il campione su terreni solidi convenzionali. È possibile conservare la parte rimanente del campione processato in frigo (2-8°C) per un uso successivo.
2. Pulire la sommità dei flaconi con una garza imbevuta in Amphyl al 2% (o un altro disinfettante tubercolocida approvato). Attendere che si asciughino prima di rimuoverli dalla cappa di sicurezza biologica.
3. Assicurarsi di miscelare correttamente i reagenti e il campione nel flacone BacT/ALERT MP.

Inoculo con dispositivi privi di ago

NOTA: evitare la contaminazione durante la preparazione del flacone e l'inoculo del campione.

1. Se si sceglie l'inoculo senza ago, rispettare le seguenti istruzioni dopo aver aggiunto asetticamente nel flacone il supplemento antibiotico o il fluido di ricostituzione nel modo descritto in questo foglietto illustrativo.
2. Rimuovere il sigillo metallico tirando la linguetta centrale verso il basso, sopra il bordo. Evitare di strappare completamente la linguetta centrale dal sigillo e continuare a tirare la linguetta intorno al flacone per rimuovere completamente il sigillo.

   ATTENZIONE: rimuovere il sigillo metallico elastico con cautela. Se la linguetta si stacca dal sigillo formando bordi taglienti, non cercare di rimuovere manualmente il sigillo. Si consiglia invece di usare una pinza emostatica o un altro dispositivo meccanico.
3. Una volta asportato il sigillo metallico, rimuovere asetticamente il tappo. Il tappo può essere rimosso facilmente facendo leva sulla fessura tra tappo e flacone.
4. Inoculare asetticamente il campione nel flacone usando un dispositivo privo di ago.
5. Riporre asetticamente il tappo sul flacone, assicurandosi di inserirlo completamente nell'apertura. Porre la capsula sigillante (BacT/ALERT® Reseal) sul tappo e sull'apertura del flacone. La capsula sigillante deve agganciarsi al bordo del flacone; il suo lato inferiore deve essere completamente a contatto con la sommità del tappo e aderire perfettamente al flacone.
6. Assicurarsi di miscelare correttamente i reagenti e il campione nel flacone BacT/ALERT MP.

Procedimento analitico

1. Caricare i flaconi BacT/ALERT MP inoculati nello strumento MB/BacT o BacT/ALERT 3D seguendo le istruzioni fornite nel manuale d'uso.
2. Una volta caricati i flaconi di coltura nello strumento, lasciarveli per 42 giorni o finché non siano determinati positivi.
3. Quando lo strumento indica che un flacone è positivo, rimuovere il flacone seguendo le procedure illustrate nel manuale d'uso BacT/ALERT.
4. Tutti i flaconi determinati positivi devono essere sottoposti a esami microscopici e posti in subcoltura per i test dei bacilli acido-resistenti (AFB). La subcoltura può essere eseguita rimuovendo il campione con un ago e una siringa dai flaconi con o senza capsula sigillante.
   a. **Subcoltura da flaconi positivi senza capsula sigillante, con ago e siringa.** Sotto la cappa di sicurezza biologica, miscelare il contenuto del flacone, disinfettare il tappo e rimuovere il campione per la colorazione acido-resistente e la subcoltura. Dopo la subcoltura, disinfettare il tappo del flacone.
   b. **Subcoltura da flaconi positivi con capsula sigillante.** Strappare la linguetta centrale dalla capsula sigillante e rimuovere completamente il sigillo dal flacone. Una volta rimosso asetticamente il tappo, è possibile prelevare il campione. Se si desidera conservare il flacone per altri test, riposizionare asetticamente il tappo e porre una nuova capsula sigillante sul tappo e sul flacone.

   Se lo striscio è positivo alla colorazione per bacilli acido-resistenti, eseguire le procedure specifiche per l'identificazione dei micobatteri adottate nel laboratorio. Se lo striscio è negativo per bacilli acido-resistenti (AFB), eseguire una colorazione di Gram. Se la colorazione per bacilli acido-resistenti e quella di Gram sono entrambe negative, è possibile che si tratti di un risultato falsamente positivo; ricaricare quindi il flacone nello strumento fino alla crescita della subcoltura o alla rideterminazione di positività o negatività. Le colture inizialmente determinate come falsamente positive e giudicate successivamente positive, devono essere sottoposte a esame microscopico e subcoltura.
5. Se in seguito alla colorazione di Gram si osservano microrganismi diversi dai micobatteri, sottoporre di nuovo tutto il contenuto del flacone a un'altra procedura di decontaminazione e inocularlo in un nuovo flacone BacT/ALERT MP, oppure gettarlo e prelevare un altro campione per la coltura. Se nel flacone BacT/ALERT MP crescono nuovamente microrganismi non-micobatterici, scartarlo e prelevare un nuovo campione per la coltura.
6. Controllare visivamente le colture segnalate negative, una volta trascorso il tempo massimo di incubazione, per vedere se presentano torbidità. Se il contenuto del flacone è torbido, prelevare asetticamente un campione per la colorazione acido-resistente e porlo in subcoltura in conformità al protocollo del laboratorio. I flaconi che non presentano torbidità possono essere gettati. Prima dell'eliminazione, decontaminare tutti i flaconi.
7. Le procedure di caricamento e scaricamento dei flaconi di coltura nello strumento MB/BacT o BacT/ALERT 3D sono fornite nel manuale d'uso.
8. **Non riutilizzare i flaconi BacT/ALERT.** Smaltire i flaconi BacT/ALERT inoculati in conformità ai protocolli del proprio laboratorio. L'autoclavaggio e/o l'incenerimento dei flaconi BacT/ALERT inoculati è appropriato.[9]

RISULTATI

La positività o negatività dei flaconi di coltura viene determinata dal software decisionale dei sistemi MB/BacT o BacT/ALERT 3D. Non è necessario alcun intervento finché lo strumento non segnala flaconi di coltura positivi o negativi.

Refertazione dei risultati

Risultati	Report
Segnale +/ Esame microscopico AFB +	Positivo per AFB; in attesa di identificazione
Segnale +/ Esame microscopico AFB -	Nessun referto; oppure campioni contaminati con microrganismi diversi dai micobatteri; impossibile determinare presenza/assenza di AFB.

Refertare i risultati preliminari soltanto dopo l'esecuzione di una colorazione acido-resistente.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni confezione di flaconi BacT/ALERT MP viene fornito di Certificato di Conformità attestante la crescita soddisfacente di *M. Tuberculosis* ATCC 25177 e *M. intracellulare* ATCC 13950. Dopo il ricevimento è possibile eseguire il controllo qualità di nuovi lotti o spedizioni di flaconi BacT/ALERT MP. Consultare CLSI/NCCLS M22-A3 per informazioni sugli appropriati ceppi di Controllo Qualità. Seguire la procedura di preparazione e inoculo del flacone:

1. Versare 0,5 ml di supplemento antibiotico MB/BacT reidratato in ogni flacone BacT/ALERT MP da testare.
2. Inoculare i flaconi con 0,5 ml dei microrganismi di controllo, diluiti a 10^4 UFC/ml con soluzione fisiologica o brodo Middlebrook 7H9 non supplementato sterile (lotto approvato).
3. Una volta ottenuti i risultati attesi, usare i flaconi rimanenti per testare i campioni clinici. Se non si ottengono i risultati attesi, rivolgersi all'assistenza clienti bioMérieux.

Strumento

Ogni strumento è corredato di un kit BacT/ALERT Reflectance Standard per il controllo di qualità e le procedure di calibrazione. Il controllo di qualità deve far parte della normale manutenzione del sistema. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale d'uso BacT/ALERT.

LIMITAZIONI DEL TEST

In pratica, non è possibile controllare le numerose variabili implicate nei test per la ricerca dei micobatteri e avere così la certezza assoluta che i risultati ottenuti siano unicamente imputabili a performance corrette o inappropriate di un terreno di coltura o del sistema di rilevazione.

1. Le colture ottenute per la diagnosi primaria dopo l'inizio di una terapia antibiotica possono produrre risultati negativi.
2. Il recupero di micobatteri nei flaconi BacT/ALERT MP dipende dalla qualità del campione prelevato, dal numero di microrganismi presenti nel volume del campione e dal metodo di trattamento. Il rispetto delle istruzioni procedurali è essenziale ai fini del recupero ottimale dei micobatteri.
3. I microrganismi sono spesso presenti in quantità esigue. Si raccomanda di prelevare i campioni per tre giorni consecutivi.
4. Un trattamento/decontaminazione inappropriati o eventuali ritardi nel trasporto dei campioni possono determinare una crescita eccessiva dei batteri e una conseguente contaminazione del brodo di coltura. L'intero terreno di coltura può contaminarsi anche a causa della presenza di un solo batterio vitale nel campione dopo il trattamento.
5. Nel supplemento antibiotico MB/BacT è possibile riscontrare contaminanti resistenti agli antibiotici.
6. La morfologia e la pigmentazione delle colonie dovrebbero essere determinate su terreno solido.
7. I flaconi BacT/ALERT MP con un segnale positivo, possono contenere una o più specie di micobatteri e/o altre specie diverse dai micobatteri. Nelle colture in brodo di più di una specie di micobatteri, è possibile che una specie a crescita lenta sia mascherata da una specie a crescita rapida oppure che la coltura sia gettata poco dopo la rilevazione della specie a crescita rapida. L'identificazione dei micobatteri presenti richiede una subcoltura e procedure supplementari volte a identificare i microrganismi presenti. La coerenza della morfologia microscopica nei flaconi BacT/ALERT MP non è stata stabilita.
8. La contaminazione con micobatteri saprofiti presenti nell'acqua corrente o in altri reagenti e apparecchiature di laboratorio può causare risultati falsamente positivi dal punto di vista clinico (recupero di micobatteri non presenti nel campione clinico).
9. Si raccomanda la decontaminazione con N-acetil-L-cisteina-idrossido di sodio. Non sono stati testati altri metodi di decontaminazione in associazione con il terreno BacT/ALERT MP. I reagenti di digestione - decontaminazione possono avere effetti nocivi sui micobatteri.
10. La acido-resistenza dei micobatteri può variare in relazione al ceppo, all'età della coltura e ad altri fattori. Tutti i flaconi BacT/ALERT MP con un segnale positivo o che appaiono torbidi, devono essere posti in subcoltura con terreni per micobatteri selettivi e non selettivi. La crescita delle specie diverse dai micobatteri può mascherare quella dei micobatteri presenti. Tali flaconi di coltura devono essere decontaminati e sottoposti a nuova coltura.
11. I flaconi BacT/ALERT MP sono incubati a 35°C per impedire il recupero di micobatteri che richiedono temperature di incubazione diverse (es. *M. marinum*, *M. ulcerans* e *M. haemophilum*). Il recupero di tali microrganismi richiede metodi di coltura supplementari. I microrganismi con particolari esigenze di crescita (es. *M. haemophilum*) possono non essere recuperati nei flaconi BacT/ALERT MP, quando vengono incubati alla temperatura appropriata. I seguenti isolati sono stati recuperati nel corso di studi analitici: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium-intracellulare*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* e *M. xenopi*. La capacità dei flaconi BacT/ALERT MP di recuperare altri isolati non comuni è sconosciuta.
12. I campioni da tessuti omogeneizzati sono difficili da inoculare nei flaconi BacT/ALERT MP con siringhe e aghi dotati di sistema di sicurezza. Al fine di garantire un inoculo adeguato del materiale nei flaconi BacT/ALERT MP, i campioni di tessuto devono essere finemente omogeneizzati. Inoltre, può essere utile usare aghi di sicurezza di diametro maggiore oppure togliere la chiusura rimovibile, versare asetticamente il campione omogeneizzato ed applicare una capsula sigillante al flacone BacT/ALERT MP. Se si sospetta contaminazione dei campioni di tessuti omogeneizzati, decontaminare e trattare prima di aggiungere nei flaconi BacT/ALERT MP. Ciò consente di recuperare la quantità massima di micobatteri eventualmente presenti.
13. Se si sospetta la presenza di *M. malmoense* o *M. genavense* potrebbe essere necessaria un'incubazione prolungata o l'aggiunta di Mycobactin J. Tali batteri richiedono un'incubazione prolungata al di là del normale periodo indicato da diversi laboratori statunitensi.[2]
14. Il supplemento antibiotico, seppure necessario per testare la maggior parte dei campioni, può inibire la crescita di alcuni micobatteri.
15. Il tasso di falsi negativi dalle valutazioni cliniche di bioMérieux è dello 0,2%.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL TEST

Sono stati condotti studi inoculando i seguenti microrganismi a concentrazioni $\leq 10^6$ UFC/flacone e $\leq 10^2$ UFC/flacone.

Microrganismo	Inoculo (UCF/flacone)	Tempo di rilevazione (giorni)[1] BacT/ALERT MP (Plastica)
Complesso TB		
M. tuberculosis (4 ceppi)	$\leq 10^6$	5,6 – 10,3
	$\leq 10^2$	13,7 – 18,8
M. bovis (2 ceppi)	$\leq 10^6$	7,1 – 7,8
	$\leq 10^2$	14,4 – 17,4
Fotocromogeni (Runyoun I)		
M. kansasii (2 ceppi)	$\leq 10^6$	7,4 – 8,8
	$\leq 10^2$	13,1 – 15,0
M. simiae	$\leq 10^6$	4,1
	$\leq 10^2$	8,9
Scotocromogeni (Runyoun II)		
M. gordonae	$\leq 10^6$	14,1
	$\leq 10^2$	23,7
M. xenopi (2 ceppi)	$\leq 10^6$	10,3 – 13,8
	$\leq 10^2$	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 ceppi)	$\leq 10^6$	12,6 – 23,3
	$\leq 10^2$	20,7 – NG[3]
Non cromogeni (Runyoun III)		
M. avium (4 ceppi)	$\leq 10^6$	4,2 – 6,8
	$\leq 10^2$	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 ceppi)	$\leq 10^6$	5,6 – 7,1
	$\leq 10^2$	10,8 – 16,2
M. malmoense	$\leq 10^6$	15,4
	$\leq 10^2$	21,9
Microrganismi a crescita rapida (Runyoun IV)		
M. chelonae	$\leq 10^6$	2,2
	$\leq 10^2$	4,1
M. fortuitum (2 ceppi)	$\leq 10^6$	3,5 – 4,1
	$\leq 10^2$	3,9 – 8,9

[1] Ogni microrganismo è stato testato con il supplemento antibiotico MB/BacT. Il test è stato condotto con flaconi in singolo ad una concentrazione $\leq 10^6$ e in triplo ad una concentrazione $\leq 10^2$. I dati elencati rappresentano un intervallo di valori ottenuti con più ceppi, salvo nel caso di *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. malmoense* e *M. chelonae* per i quali i dati forniti sono stati ottenuti da un singolo ceppo.
[2] Uno dei tre flaconi non ha evidenziato alcuna crescita dopo 42 giorni; il valore fornito è la media di due flaconi.
[3] Uno dei microrganismi testati non ha evidenziato alcuna crescita in tre flaconi su tre, dopo 42 giorni.

BIBLIOGRAFIA

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

DISPONIBILITÀ

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/confezione	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 test per Kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 flaconi per kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 flaconi per kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 unità per scatola	REF 259787

Per l'assistenza tecnica negli USA, contattare l'assistenza clienti bioMérieux al numero verde +1-800-682-2666. Al di fuori degli USA, contattare il rappresentante locale bioMérieux.

bioMérieux, il logo blu e BacT/ALERT sono marchi utilizzati, in corso di registrazione e/o registrati di proprietà di bioMérieux SA o di una delle sue filiali.

Amphyl è un marchio depositato di Linden Corporation.

ATCC è un marchio depositato di American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Luglio 2008

BacT/ALERT® MP

NORSK

43-03064

BETEGNER REVIDERT DEL

Oppbevares beskyttet mot direkte sollys mellom 2-8 °C.

Se oversikt over symboler på slutten av pakningsvedlegget.

ANVENDELSE

BacT/ALERT® MP-systemet består av BacT/ALERT MP-kulturflaske med en avtagbar lukkemekanisme og brukes sammen med MB/BacT® antibiotisk supplement (og/eller MB/BacT rekonstitueringsvæske). BacT/ALERT MP-systemet er utformet for bruk sammen med MB/BacT eller BacT/ALERT® 3D mykobakteriedeteksjonssystemer for gjenvinning og påvisning av mykobakterier fra andre sterile kroppsmaterialer enn blod, og fra fordøyde og dekontaminerte kliniske prøver.

OPPSUMMERING OG FORKLARING

Tuberkulose er fortsatt et alvorlig, globalt, allment helseproblem. Verdens helseorganisasjon anslår at 9 millioner nye tilfeller og 2 millioner dødsfall er en direkte følge av denne sykdommen hvert år.[1] Tuberkulose er oppført som den ledende dødsårsaken i mange ressursfattige utviklingsland.[2] I USA forekom det høyeste antall nye tilfeller rapportert til CDC i 1992.[2,3] Siden den gang har det vært en jevn og betydelig nedgang i årlige rapporterte tilfeller i USA, i stor grad på grunn av iverksettelse av forebyggende og overvåkende tiltak fra 1989 til og med 1993.[2] Men det er fortsatt en betydelig økning av antall tilfeller innen enkelte befolkningsgrupper, spesielt blant personer født utenfor USA. Infeksjoner forårsaket av *M. tuberculosis* komplekse organismer er typisk lungerelaterte.

Andre mykobakterier enn tuberkelbakterien (MOTT) vil her refereres til som ikke-tuberkulose mykobakterier (NTM). Flesteparten av disse isolatene krever inkubering ved 35 til 37 °C om ikke annet spesifiseres. Disse organismene finnes vanligvis i jord og vann og er implisert opportunistiske patogener i pasienter med underliggende lungesykdommer, immunsuppresjon eller ved perkutant traume.[4] Følgende NTM er assosiert med lungesykdommer: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. fortuitum complex*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. shimoidei*, *M. celatum*, og *M. xenopi* (optimal temperatur på 42 °C). *M. marinum* og *M. ulcerans*, som krever inkubering ved 30 °C, er NTM assosiert med hudinfeksjoner. Følgende NTM produserer andre typer infeksjoner (for eksempel utbredte sykdomsformer, lymfadenitt osv.): MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*-kompleks (*M. chelonae*-isolater kan kreve inkubering ved 30 °C), *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. genavense*, *M. celatum* og *M. haemophilum* (krever tilsetning av hemin og inkubering ved 30 °C).[2]

Mycobakterier er aerobe, ikke-sporedannende, ikke-motile, syrefaste stavbakterier med langsom til svært langsom veksthastighet. Artenes genereringstid varierer fra 2 til >20 timer avhengig av art.[2] Vekst av *M. tuberculosis* ved bruk av tradisjonelle mykobakterie-dyrkningsmedier kan ta to til åtte uker eller mer.[5] CDCs anbefalinger foreslår bruk av et flytende kulturmedium sammen med faste medier for primærkulturer.[6,7] Flytende kultur-metoden er nødvendig for å sørge for raskere vekst, påvisning og følsomhetsresultater for *M. tuberculosis*.[7]

Når MB/BacT og BacT/ALERT 3D mykobakteriedeteksjonssystemene er brukt sammen med BacT/ALERT MP-systemet, består både av et mikrobielt deteksjonssystem og et kulturmedium med ideelt miljø og næringsforhold for gjenvinning av mykobakteriearter som ofte er isolert fra andre pasientmaterialer enn blod. MB/BacT antibiotika supplement er tiltenkt for reduksjon av tilfeller med gjennombruddskontaminasjon forårsaket av bakterier som overlever dekontaminerings-/konsentrasjonsprosessen. MB/BacT antibiotika supplement må tilsettes BacT/ALERT MP-flaskene før inkulering av alle ikke-sterile prøver. For gjenvinning av mykobakterier tilstede i sterile prøver skal kun rekonstitueringsvæske tilsettes BacT/ALERT MP-flaskene. MB/BacT rekonstitueringsvæske inneholder komponenter som er nødvendige for å sørge for optimal vekst av mykobakteriene som er tilstede i pasientprøven. Inokulerte flasker plasseres i instrumentet hvor de inkuberes og overvåkes kontinuerlig for tilstedeværelse av mykobakterier som vil vokse i BacT/ALERT MP-kulturflasker.

TESTENS PRINSIPP

MB/BacT og BacT/ALERT 3D mykobakteriedeteksjonssystemer anvender det samme prinsippet for å påvise mikroorganismer i mykobakterielle kulturer som er beskrevet for BacT/ALERT® mikrobielt deteksjonssystem når det gjelder blodkulturer.[8] MB/BacT og BacT/ALERT 3D mykobakterielle deteksjonssystemer anvender en kolorimetrisk sensor og reflektert lys for å overvåke tilstedeværelse og produksjon av karbondioksid (CO_2) oppløst i kulturmediet. Hvis det finnes mikroorganismer i testprøven, vil karbondioksid produseres etter hvert som organismene metaboliserer substrater i kulturmediet. Når mikroorganismer i vekst produserer CO_2, vil fargen på den gassgjennomtrengbare sensoren installert i bunnen av hver kulturflaske endres til lysegrønn eller gul.[1] Den lysere fargen resulterer i en økning av reflektansenhetene som overvåkes av systemet. Flaskereflektansen overvåkes og registreres av instrumentet hvert tiende minutt. Ved påvisningstidspunktet er omtrentlige kolonidannende enheter (CFUer) 10^6-10^7 pr. ml.

REAGENSER

Til *in vitro* diagnostisk bruk.

ADVARSEL: For å redusere risikoen for utilsiktet eksponering for smittestoffer, må ytterligere forholdsregler følges ved bruk av BacT/ALERT MP kulturflaske i BacT/ALERT mikrobielt deteksjonssystem. Det er høyt anbefalt at instrumentet plasseres i et laboratorium som benyttes til rutinedyrking av *M. tuberculosis*. For aktiviteter som omfatter propagering og manipulering av *M. tuberculosis* eller *Mycobacterium sp.* dyrket i kultur, anbefales biosikkerhetsrutiner på nivå 3, oppbevaringsutstyr og fasiliteter.[9]

BacT/ALERT® MP (med rød fargekode) – BacT/ALERT MP engangskulturflasker med avtagbar lukkemekanisme inneholder 10 ml medium samt en indre sensor som påviser karbondioksid som en indikator for mikrobevekst. BacT/ALERT MP-kulturflasken kan inokuleres via en steril sprøyte med enten en påfestet låsbar nål eller en nål med hylse eller ved å fjerne lukkemekanismen og bruke en inokuleringsinnretning uten nål.

Mediesammensetningen består av: Middlebrook 7H9 buljong (0,47 % w/v), pankreaskonsentrert kasein (0,1 % w/v), bovint serumalbumin (1.0% w/v), katalase (48 u/ml) i renset vann. Flaskene inneholder 10 ml medium og er behandlet med en atmosfære av CO_2, nitrogen og oksygen under vakuum. Mediekomposisjonen kan tilpasses for å oppfylle spesifikke krav til ytelse.

ADVARSEL: BacT/ALERT kulturflasker inneholder polykarbonat. Ikke alle desinfeksjonsmidler er ment for bruk med polykarbonatoverflater og kan forårsake flaskeforringelse. Bekreft desinfeksjonsmiddelets kompatibilitet med polykarbonat før bruk på BacT/ALERT kulturflaskeoverflater.

ADVARSEL: Det er mulig at enkelte sjeldne, kravfulle mykobakterier ikke vil vokse eller kan vokse langsomt i BacT/ALERT MP-kulturflaskens vekstmedium. Dersom det er mistanke om at sjeldne, kravfulle mykobakterier som krever spesialiserte media og kulturatmosfærer er tilstede, bør alternative gjenvinningsmetoder eller forlenget inkuberingstid vurderes.

ADVARSEL: Ved sjeldne tilfeller kan det finnes forekomst av organismer som vokser i BacT/ALERT MP-kulturflaskens vekstmedium, men som ikke produserer tilstrekkelige mengder karbondioksid til å kunne bestemmes som positiv. For eksempel kan prøver fra pasienter som gjennomgår behandling med antimykobakterielle midler vise nedsatt vekst.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – lyofilisert tilskudd blandet til å inneholde Amphotericin B (0,0180 % w/v), Azlocillin (0,0034 % w/v), Nalidixinsyre (0,0400 % w/v), Polymyxin B (10 000 enheter), Trimetoprim (0,00105 % w/v), Vancomycin (0,0005 % w/v), og et svellingsmiddel før behandling. Supplementsammensetningen kan tilpasses for å oppfylle spesifikke krav til ytelse. Rekonstituer med 10 ml MB/BacT rekonstitueringsvæske.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – oleinsyre (0,05 % w/v), glycerol (5 % w/v), Amarant (0,004 % w/v), og bovint serum albumin (1 % w/v) i renset vann. Hver flaske inneholder et totalvolum på 15 ml. Rekonstitueringsvæskesammensetningen kan tilpasses for å oppfylle spesifikke krav til ytelse.

Nødvendig tilleggsmateriale

MB/BacT eller BacT/ALERT 3D mykobakteriedeteksjonssystem
Sterilt, destillert eller avionisert vann
Middlebrook 7H11 eller annen mykobakteriell agar eller egg-basert medium
Autoklav
N-acetyl-L-cystein-pulver
Steril 0,067 M fosfatbuffer, pH 6,8
Sentrifuge
CO_2 inkubator, 37 °C
Sterile sprøyter enten med påfestede låsbare kanyler eller kanyler med hylse.
Sterile pipetter eller annet sterilt inokuleringsutstyr uten kanyle, for flasker hvor lukkemekanismen har blitt fjernet
BacT/ALERT® gjenforsegling for avtagbart lukkesystem
Mykobaktericid desinfeksjonsmiddel
Vattpinner trukket i alkohol
Vortexmikser
Sterile 50 ml koniske polypropylen sentrifugerør
Biologisk sikkerhetskabinett
Sterile engangshansker
Engangsfrakker
Engangsmasker
Mikroskop
Materiell til farging av utstryk
Kvalitetskontrollorganismer

Materiell tilgjengelig fra bioMérieux

MB/BacT mykobakteriedeteksjonssystem og BacT/ALERT mikrobielle deteksjonssystemer

Forholdsregler

1. POTENSIELT SMITTEFARLIGE TESTPRØVER. Alminnelige forholdsregler for håndtering og avhending av smittefarlig materiale skal overholdes.
2. For å arbeide med komplekse *M. tuberculosis*-organismer dyrket i kultur, kreves det biosikkerhetsrutiner på nivå 3, utstyr for å forhindre spredning og fasiliteter.[9]
3. Alle inokulerte BacT/ALERT MP-kulturflasker, prøvetakingsutstyr, sprøyter, pipetter og andre inokuleringsinnretninger uten nål brukt til inokulering skal dekontamineres i henhold til din institusjons prosedyrer.[2]
4. Ved søl eller lekkasje kan en aerosol av mykobakterier (inkludert *M. tuberculosis*) eller andre bakterier produseres. Følg de spesifikke sikkerhetsretningslinjene for din institusjon og CDC/NIH.[9] Fenolholdige-desinfeksjonsmidler som Amphyl® er egnede midler for dekontaminering av mykobakterier og andre mikroorganismer.
5. Disse kulturflaskene bør kun brukes av instruert laboratoriepersonell.

Oppbevaring

BacT/ALERT MP-kulturflasker og MB/BacT antibiotika supplementsett skal oppbevares kjølig (2-8 °C). Beskyttes mot direkte sollys. BacT/ALERT MP-kulturflasker må tilpasses romtemperatur (30-60 minutter) før bruk. En utløpsdato er trykket på hver flaskeetikett. Ikke bruk kulturflaskene etter den siste dagen i den måneden som er angitt.

INSTRUMENTER

Gå gjennom den relevante brukerhåndboken for BacT/ALERT mikrobedeteksjonssystem samt tillegget til MB/BacT brukerhåndbok før bruk.

PRØVETAKING OG FORBEREDELSE

Korrekt prøvetaking, transport, håndtering og forberedelse er svært viktig for nøyaktig analyse av pasientkulturer hvor mykobakteriearter kan være tilstede. Prøver skal tas og behandles i henhold til håndboken for kliniske mikrobiologiske prosedyrer[10] eller i henhold til ditt laboratoriums håndbok for prosedyrer. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroksid anbefales for behandling av usterile prøver.

MERK: bioMérieux anbefaler at den endelige pH på inokulumprøven er mellom 6,8-7,2.

PROSEDYRER

1. Før bruk bør BacT/ALERT MP-kulturflaskene inspiseres for tegn på skade eller forringelse (misfarging). Flasker som utviser tegn på skade, lekkasje eller forringelse skal kastes. Mediet skal være gjennomsiktig, men bunnfall kan dannes ved temperaturer under 20 °C. Bunnfall må ikke forveksles med turbiditet. Ikke bruk flasker som enten inneholder medium som utviser turbiditet eller en gul sensor eller økt gasstrykk, da disse er tegn på mulig kontaminasjon.
2. Før bruk skal alle MB/BacT rekonstitueringsvæskeampullene inspiseres visuelt for tegn på skade eller kontaminering. Hvis det finnes tegn på sprekker eller lekkasje skal ampullen ikke brukes.
3. Før bruk skal alle MB/BacT ampullene med antibiotika supplement inspiseres visuelt for tegn på sprekker eller degradering av tørrstoffkaken. Hvis det finnes tegn på sprekker eller degradering, skal ampullen ikke brukes.
4. Bruk sprøyter med luer-lås eller sprøyter med påfestede nåler i hylse når lukkemekanismen ikke er fjernet for inokulering.
5. Inokulerte flasker skal alltid bæres i et stativ eller kurv.

Klargjøring av MB/BacT antibiotika supplement

Før bruk, overfør 10 ml MB/BacT rekonstitueringsvæske aseptisk til hver ampulle med MB/BacT antibiotika supplement som kreves for testing. La det dehydrerte stoffet oppløses. Virvle forsiktig for å blande innholdet.

MERKNADER:
- En ampulle med rekonstituert MB/BacT antibiotika supplement er tilstrekkelig for 20 BacT/ALERT MP-kulturflasker.
- Når MB/BacT antibiotika supplement har blitt rekonstituert har det en oppbevaringstid på 7 dager når det oppbevares ved 2-8 °C. Utløpsdatoen for det rekonstituerte supplementet skal oppføres på ampulle-etiketten.
- Gjenværende rekonstitueringsvæske kan oppbevares ved 2-8 °C for senere bruk med sterile prøver.

Klargjøring og inokulering av flasker

MERK: Vær nøye med å unngå kontaminering under både klargjøring og inokulering av flasker med pasientprøve.

1. Merk hver BacT/ALERT MP-kulturflaske med korrekt pasientinformasjon. Ikonene på flaskeetiketten (☺,#,🕑) kan defineres av brukeren. Flasker må tilpasses romtemperatur (30-60 minutter) før inokulering.
2. Desinfiser septumet med en kompress fuktet med alkohol eller lignende. La septumet tørke før enten det rekonstituerte antibiotiske tillegget eller rekonstitueringsvæsken tilsettes flasken.
3. Før inokulering, overfør 0,5 ml rekonstituert MB/BacT antibiotika supplement aseptisk til hver BacT/ALERT MP-kulturflaske som skal brukes for kulturer med usterile prøver, eller kun 0,5 ml MB/BacT rekonstitueringsvæske til hver BacT/ALERT kulturflaske som skal brukes for kulturer med sterile prøver. MB/BacT rekonstitueringsvæske inneholder komponenter som er nødvendige for optimal vekst av mykobakteriene som er tilstede i pasientprøvene.
   a. Overfør det rekonstituerte antibiotika supplementet eller rekonstitueringsvæsken aseptisk til hver BacT/ALERT MP-kulturflaske.
   b. En rosa fargenyanse i mediet indikerer at tilsetningen av supplementet eller rekonstitueringsvæsken var vellykket.

MERK: Følgende trinn må utføres i et biologisk sikkerhetskabinett mens egnede verneklær brukes for å overholde sikkerhetsstandarder etablert av CDC/NIH biosikkerhetsretningslinjer på nivå 3.[9]

Inokulering med sikkerhetskanyle

1. Sug opp behandlet eller steril pasientprøve med en sprøyte med påfestet låsbar nål eller en nål i hylse og overfør aseptisk 0,5 ml til en korrekt merket BacT/ALERT MP-kulturflaske. Ventilering er ikke nødvendig. Samtidig inokulering av konvensjonelle faste media anbefales. Resten av den behandlede prøven kan lagres ved nedkjøling (2-8 °C) for senere bruk.
2. Rens flasketoppene med gasbind som har blitt gjennomvætet i 2 % Amphyl (eller annet godkjent tuberkel-desinfiseringsmiddel). La flasketoppene tørke før de flyttes fra det biologiske sikkerhetskabinettet.
3. Sikre riktig blanding av reagenser og prøve i BacT/ALERT MP-flasken.

Inokulering ved bruk av innretninger uten kanyle

MERK: Vær nøye med å unngå kontaminering under både klargjøring og inokulering av flasker med pasientprøve.

1. Dersom aseptisk inokulering uten nål velges, skal instruksjonene nedenfor følges etter at det antibiotiske supplementet eller rekonstitueringsvæsken har blitt overført aseptisk til flasken som beskrevet i dette pakningsvedlegget.
2. Fjern metallforseglingen ved å trekke den midterste fliken over toppen og ned gjennom kanten av forseglingen. Unngå å rive fliken helt av forseglingen. Fortsett med å trekke fliken rundt flasken for å fjerne forseglingen helt fra flasken.

   ADVARSEL: Vær forsiktig når du fjerner klemmeforseglingen av metall. Ikke prøv å fjerne forseglingen for hånd dersom fliken rives av forseglingen og skarpe kanter blir igjen. Istedenfor anbefales bruk av hemostat eller annen mekanisk innretning.
3. Etter fjerning av metallforseglingen, fjern septumet aseptisk. Det kan være enklere å fjerne septumet hvis det vippes ut av flasken fra en av sidene av septumsspalten.
4. Inokuler prøven aseptisk i flasken ved hjelp av en innretning uten nål.
5. Plasser septumet aseptisk tilbake i flasken, og sørg for at septumet passer helt inn i åpningen. Plasser en gjenforsegling (BacT/ALERT® gjenforsegling) over septumet og flaskeåpninge. Gjenforseglingen må klemmes på plass over flaskekanten, og undersiden av gjenforseglingen må være i full kontakt med øverste del av septumet. Gjenforseglingen skal sitte godt fast på flasken.
6. Sikre riktig blanding av reagenser og prøve i BacT/ALERT MP-flasken.

Testprosedyre

1. Sett de inokulerte BacT/ALERT MP-kulturflaskene inn i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D instrumentet i henhold til instruksjonene som er oppgitt i den relevante brukerhåndboken.
2. Etter at kulturflaskene har blitt lastet inn i instrumentet skal de forbli der i 42 dager eller til de har flagget ut positive.
3. Når instrumentet indikerer en positiv flaske, skal flasken fjernes i henhold til prosedyrer oppgitt i BacT/ALERT brukerhåndboken.
4. Utfør mikroskopering og subkultiver for syrefaste basiller i alle flasker som er fastslått å være positive. Subkultivering kan utføres ved å fjerne prøven med nål og sprøyte fra flasker med eller uten gjenforsegling.
   a. **Subkultivering fra positive flasker uten gjenforsegling ved bruk av nål og sprøyte.** Bland flaskeinnholdet, desinfiser flaskeproppen og ta materiale til farging av syrefaste basiller og subkultivering i et biologisk sikkerhetskabinett. Desinfiser flaskeproppen etter subkultivering.
   b. **Subkultivering fra positive flasker som har blitt forseglet med gjenforsegling.** Trekk den midtre fliken bort fra gjenforseglingen og fjern forseglingen helt fra flasken. Etter at septumet har blitt fjernet aseptisk kan prøven fjernes. Dersom det er ønskelig å beholde flasken for videre testing, kan proppen gjenplasseres aseptisk og en ny gjenforsegling plasseres over proppen og flasken.

   Dersom mikroskopering med hensyn på syrefastestaver er positiv, fortsett med de spesifikke identifikasjonsprosedyrer for mykobakterier som brukes av din institusjon. Dersom den konsentrerte utstryksprøven for syrefaste basiller er negativ bør en gram-farging utføres. Hvis både mikroskoperingen for syrefaste basiller og gram-fargingen er negative og indikerer en mulig falsk positiv, skal flasken lastes inn i instrumentet på nytt, til vekst av subkulturen er tydelig eller til flasken igjen flagger ut positiv eller negativ. Utfør mikroskopi og subkultiver på alle kulturer som innledningsvis ble fastslått å være falsk positive, men som senere igjen ble fastslått å være positive.
5. Hvis ikke-mykobakterielle organismer finnes i gram-fargingen, skal hele flaskeinnholdet behandles på nytt gjennom en alternativ dekontaminerings-prosedyre og inokuleres inn i en ny BacT/ALERT MP-kulturflaske, eller flaskeinnholdet kasseres og ny prøve tas for kulturen. Hvis ikke-mykobakterielle organismer igjen vokser i den nye BacT/ALERT MP kulturflasken, kasser prøven og få tak i ny prøve for kulturen.
6. Kulturer som signaliserer negativt ved maksimal testtid skal inspiseres visuelt for turbiditet. Hvis flaskeinnholdet er uklart, ta ved hjelp av aseptiske teknikker en ny fargeprøve for syrefaste mikrober og subkultiver i henhold til ditt laboratoriums protokoll. Flasker som ikke viser turbiditet kan kasseres. Dekontaminer alle flasker før kassering.
7. Prosedyrer for innsetting og uttak av kulturflasker i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D instrumentet finnes i brukerhåndboken.
8. **Ikke bruk BacT/ALERT kulturflasker på nytt.** Kast inokulerte BacT/ALERT-kulturflasker i henhold til laboratorieprotokollen. Autoklavering og/eller forbrenning av inokulerte BacT/ALERT-flasker er hensiktsmessig.[9]

RESULTATER

Positiv eller negativ status av kulturer bestemmes av en beslutningsprogramvare som finnes i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D mykobakteriedeteksjonssystemer. Ingen handling er nødvendig før instrumentet gir signal om positive eller negative kulturflasker.

Rapportering av resultater

Resultater	Rapport
Signal+/AFB utstryk +	AFB positiv; identifisering avventes
Signal+/AFB utstryk –	Ingen rapport; eller prøve kontaminert med ikke-mykobakterielle organismer; ikke i stand til å bestemme nærvær eller fravær av AFB

Rapporter foreløpige resultater kun etter at mikroskopering for syrefaste mikrober er utført.

KVALITETSKONTROLL

Et samsvarssertifikat medfølger hver eske med BacT/ALERT MP kulturflasker. Dette angir tilfredsstillende vekst av *M. tuberculosis* ATCC 25177 og *M. intracellulare* ATCC 13950. Ved mottak, kan nye partier eller forsendelser av BacT/ALERT MP kulturflasker eller reagenser kvalitetskontrolltestes. Se CLSI/NCCLS M22-A3 for passende kvalitetskontrollorganismer. Følg prosedyren for flaskeklargjøring og inokulering:

1. Overfør 0,5 ml rehydrert MB/BacT antibiotika supplement til hver BacT/ALERT MP-kulturflaske som kreves for testing.
2. Inokuler representative flasker med 0,5 ml av kontrollorganismene, fortynnet til 10^4 CFU/ml i sterilt, fysiologisk saltløsning eller steril Middlebrook 7H9-buljong uten supplement (godkjent parti).
3. Etter at forventede resultater er oppnådd, bruk så de resterende flaskene til å teste kliniske prøver. Dersom forventede resultater ikke oppnås, ta kontakt med bioMérieux kundeservice.

Instrument

Et BacT/ALERT reflektansstandardsett medfølger hvert instrument for kvalitetskontroll- og kalibreringsprosedyrer. Alle kvalitetskontroller skal være en del av normalt systemvedlikehold. Se BacT/ALERTs brukerhåndbok for mer informasjon.

TESTBEGRENSNINGER

Mange variabler involvert i mykobakterietesting kan i praksis ikke kontrolleres for å angi total visshet om at oppnådde resultater utelukkende skyldes korrekt eller ukorrekt ytelse av et av kulturmediene eller deteksjonssystemet.

1. Kulturer tatt for primær diagnose etter at antibiotikabehandling er påbegynt, kan føre til negative resultater.
2. Gjenvinning av mykobakterier i BacT/ALERT MP-flasker avhenger av kvaliteten på prøven som er tatt, antall dyrkbare organismer i prøvevolumet, og behandlingsmetoden. Nøye overholdelse av prosedyreinstruksjonene er kritisk for optimal gjenvinning av mykobakterier.
3. Antall organismer er ofte lavt. Det anbefales derfor normalt at prøver tas over tre sammenhengende dager.
4. Feilbehandling/dekontaminering eller forsinkelser i transport av prøver kan resultere i for stor bakterievekst, noe som kan føre til at buljongkulturen kontamineres. Hele kulturmediet kan kontamineres hvis så mye som en levedyktig bakterie er tilstede i prøven etter behandling.
5. Kontaminanter som er motstandsdyktige mot antibiotikaen i MB/BacT antibiotika supplementet kan forekomme.
6. Kolonimorfologi og pigmentering skal kun bestemmes på fast medium.
7. BacT/ALERT MP kulturflasker med et positivt signal kan inneholde én eller flere mykobakteriearter og/eller andre ikke-mykobakteriearter. I blandede mykobakteriekulturer i buljong kan en organisme som er langsomtvoksende utkonkurreres av en hurtigvoksende, eller kulturen kasseres for tidlig etter at den hurtigvoksende organismen er blitt påvist. Identifikasjon av tilstedeværende mykobakterier krever subkultivering og tilleggsprosedyrer for å identifisere organismer som er tilstede. Påliteligheten til mikroskopisk morfologi i BacT/ALERT MP-kulturflasker har ikke blitt etablert.
8. Kontaminering med saprofytiske mykobakterier fra springvann eller andre laboratoriereagenser og utstyr kan forårsake "klinisk" falsk-positive resultater (gjenvinning av mykobakterier som ikke finnes i den kliniske prøven).
9. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natrium hydroksid-metoden anbefales. Andre dekontamineringsmetoder har ikke blitt testet i forbindelse med BacT/ALERT MP kulturmiddel. Nedbrytende dekontaminantreagenser kan ha skadelige innvirkninger på mykobakterier.
10. Mykobakterier kan variere mht. syrefasthet avhengig av stamme, kulturens alder og andre variabler. Alle flasker med et positivt BacT/ALERT MP-signal eller som viser turbiditet skal subkultiveres til både mykobakterieselektive og ikke-selektive medier. Ikke-mykobakteriearter kan vokse over tilstedeværende mykobakterier. Slike kulturflasker skal dekontamineres og kultiveres på nytt.
11. BacT/ALERT MP-kulturflasker inkuberes ved 35 °C for å forhindre gjenvinning av mykobakterier som krever andre inkubasjonstemperaturer (f.eks. *M. marinum*, *M. ulcerans*, og *M. haemophilum*). Gjenvinning av slike organismer krever ytterligere kulturmetoder. Organismer med spesielle krav til vekst (f.eks. *M. haemophilum*) kan muligens ikke gjenvinnes i BacT/ALERT MP-flasker selv om de inkuberes ved riktig temperatur. Følgende isolater har blitt gjenvunnet i analytiske studier: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium-intracellulare*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, og *M. xenopi*. BacT/ALERT MP-flaskenes evne til å gjenvinne andre uvanlige isolater er ukjent.
12. Det er vanskelig å inokulere BacT/ALERT MP-kulturflasker med malt/mortret vev og sikkerhetskanyler og sprøyter. For å sørge for korrekt inokulering må vevsprøver males fint nok til å tillate korrekt inokulering av materialet i BacT/ALERT MP-flaskene. I tillegg kan det lønne seg å bruke sikkerhetskanyler av større mål, eller å fjerne avtagbare lukkemekanismer, tilføre den malte prøven aseptisk og bruke en gjenforsegling på BacT/ALERT MP-kulturflasken. Hvis det mistenkes at malt/mortret vev er kontaminert, dekontaminer og behandle før tilføring til BacT/ALERT MP-flasker. Dette vil tillate maksimal gjenvinning av tilstedeværende mykobakterier.
13. Forlenget inkubering eller tilsetning av Mykobactin J kan være nødvendig når det foreligger mistanke om *M. malmoense* eller *M. genavense*. *M. malmoense* og *M. genavense* er kjente for å kreve forlenget inkubering utover de normale inkuberingsprotokoll som anvendes av mange amerikanske laboratorier.[2]
14. Antibiotikasupplementet kan mulig hemme veksten av enkelte mykobakterier, på tross av at supplementet er nødvendig for testing av slike prøver.
15. Falske negative resultater fra bioMérieuxs kliniske evaluering var 0,2 %.

TESTENS YTELSESEGENSKAPER

Dyrkningsstudier ble utført ved bruk av følgende organismer med volumer på ≤10^6 CFU/flaske og ≤10^2 CFU/flaske.

Mikroorganisme	Inokulat (CFU/flaske)	Deteksjonstid (antall dager)[1] BacT/ALERT MP (Plast)
TB kompleks		
M. tuberculosis (4 stammer)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 stammer)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotokromogener (Runyoun I)		
M. kansasii (2 stammer)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Scotokromogener (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 stammer)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 stammer)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Ikke-kromogener (Runyoun III)		
M. avium (4 stammer)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 stammer)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Hurtigvoksende bakterier (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 stammer)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Hver organisme ble testet med MB/BacT antibiotika supplement. Testing ble utført enkeltvis for flasker ved ≤ 10^6 og tre ganger ved ≤10^2. De oppførte data representerer et verdiområde fra flere stammer, med unntak av *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. malmoense*, og *M. chelonae* hvor data for individuelle organismer er oppgitt.
[2] En av tre flasker viste ingen vekst etter 42 dager; den oppgitte verdien er gjennomsnittet av to flasker.
[3] En organisme som ble testet viste ingen vekst i tre av tre flasker etter 42 dager.

REFERANSELISTE

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

TILGJENGELIGHET

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/eske	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 tester/pk	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 ampuller/pk	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 ampuller/pk	
BacT/ALERT® Reseal	100 enheter/boks	REF 259787

For teknisk støtte i USA, ta kontakt med bioMérieux kundeservice, tlf: 1-800-682-2666. Utenfor USA, ta kontakt med din lokale bioMérieux-representant.

bioMérieux, den blå logo og BacT/ALERT er varemerker som enten er i bruk, under behandling og/eller registrert og som tilhører bioMérieux SA eller et av datterselskapene.

Amphyl er et registrert varemerke som tilhører Linden Corporation.

ATCC er et registrert varemerke som tilhører American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Juli 2008

BacT/ALERT® MP

POLSKI

43-03064

OZNACZA CZĘŚĆ Z POPRAWKAMI

Przechowywać w temp. 2–8°C, chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego.

Zob. słownik symboli na końcu ulotki.

ZASTOSOWANIE

System BacT/ALERT® MP składa się z butelki hodowlanej BacT/ALERT MP ze zdejmowanym zamknięciem, używanej wraz z suplementem MB/BacT® Antibiotic Supplement (oraz/lub płynem do rekonstytucji MB/BacT Reconstitution Fluid). System BacT/ALERT MP jest przeznaczony do stosowania z systemami wykrywania mykobakterii MB/BacT lub BacT/ALERT® 3D w celu hodowania oraz wykrywania mykobakterii z jałowych płynów ustrojowych innych niż krew oraz z poddanych upłynnieniu i dekontaminacji próbek klinicznych.

PODSUMOWANIE I OBJAŚNIENIA

Gruźlica stanowi wciąż znaczny problem zdrowia publicznego na świecie. Światowa Organizacja Zdrowia ocenia, że corocznie choroba ta jest bezpośrednim powodem 9 milionów nowych zachorowań oraz 2 milionów zgonów [1]. Gruźlica uznawana jest za główną przyczynę śmierci w wielu krajach ubogich oraz rozwijających się [2]. W Stanach Zjednoczonych liczba nowych przypadków zgłaszanych do CDC (Centrum Kontroli Chorób) była najwyższa w roku 1992 [2,3]. Od tego czasu notowano stały i znaczny spadek liczby przypadków zgłaszanych corocznie w Stanach Zjednoczonych, w dużym stopniu dzięki wdrożeniu środków prewencji oraz kontroli w okresie od 1989 do 1993 roku [2]. Nadal jednak występuje znamienny wzrost liczby przypadków w niektórych grupach populacyjnych, szczególnie wśród osób urodzonych poza Stanami Zjednoczonymi oraz ich terytoriami. Infekcje wywoływane przez drobnoustroje *M. tuberculosis* complex dotyczą zwykle płuc.

Mykobakterie inne niż prątek gruźlicy (MOTT) określane są jako mykobakterie niegruźlicze (NTM). Większość z tych izolatów wymaga inkubacji w temp. od 35 do 37°C, o ile nie zaznaczono inaczej. Mikroorganizmy te najczęściej są izolowane z gleby oraz z wody i uznawane są za patogeny oportunistyczne u pacjentów ze współistniejącymi chorobami płuc, immunosupresją lub urazem przezskórnym [4]. Mykobakterie niegruźlicze związane z chorobami płuc to: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* oraz *M. xenopi* (optymalna temperatura wynosi 42°C). *M. marinum* i *M. ulcerans*, wymagające inkubacji w temperaturze 30°C, to mykobakterie niegruźlicze związane z zakażeniami skórnymi. Mykobakterie niegruźlicze powodujące inne rodzaje zakażeń (np. postać rozsianą choroby, zapalenie węzłów chłonnych itp.) to: MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* complex (izolaty *M. chelonae* mogą wymagać inkubacji w temperaturze 30°C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* oraz *M. haemophilum* (wymaga dodatku heminy i inkubacji w temperaturze 30°C) [2].

Prątki z rodzaju *Mycobacterium* są to pałeczki tlenowe, nie tworzące przetrwalników, nieruchome, kwasooporne, o tempie wzrostu wolnym do bardzo wolnego; czas generacji dla poszczególnych gatunków wynosi od 2 do ponad 20 godzin [2]. Wzrost *M. tuberculosis* przy zastosowaniu tradycyjnych podłoży dla mykobakterii może trwać od dwóch do ośmiu tygodni lub więcej [5]. CDC (Centrum Kontroli Chorób) zaleca stosowanie podłoży płynnych wraz ze stałymi dla hodowli pierwotnych [6,7]. Metoda z pożywkami płynnymi wymagana jest dla szybszego wykrywania, wzrostu oraz oceny oporności dla *M. tuberculosis* [7].

Systemy wykrywania mykobakterii MB/BacT oraz BacT/ALERT 3D, stosowane w połączeniu z systemem BacT/ALERT MP, dostarczają możliwości wykrywania mikroorganizmów oraz podłoży hodowlanych o odpowiednich warunkach odżywczych i środowiskowych dla rozwoju gatunków mykobakterii często izolowanych z próbek innych niż krew. Preparat MB/BacT Antibiotic Supplement jest przeznaczony do zmniejszenia częstości występowania zanieczyszczenia powodowanego bakteriami, które mogą przetrwać proces dekontaminacji/koncentracji. Preparat MB/BacT Antibiotic Supplement musi być dodany do butelek BacT/ALERT MP przed posianiem wszelkich próbek niejałowych. W celu uzyskania wzrostu mykobakterii obecnych w próbkach jałowych, do butelek BacT/ALERT MP należy dodać wyłącznie płynu do rekonstytucji. Płyn MB/BacT Reconstitution Fluid zawiera składniki niezbędne do zapewnienia optymalnego wzrostu mykobakterii obecnych w próbkach uzyskanych od pacjentów. Posiane butelki umieszcza się w urządzeniu, gdzie podlegają inkubacji oraz stałemu monitorowaniu na obecność mykobakterii rozwijających się w butelce hodowlanej BacT/ALERT MP.

ZASADA BADANIA

Systemy wykrywania mykobakterii MB/BacT oraz BacT/ALERT 3D wykorzystują taką samą zasadę wykrywania mikroorganizmów w hodowlach mykobakterii, jak zasada opisana dla systemów detekcji drobnoustrojów BacT/ALERT® w odniesieniu do hodowli z krwi [8]. Systemy wykrywania mykobakterii MB/BacT oraz BacT/ALERT 3D wykorzystują czujnik kolorymetryczny i światło odbite do monitorowania obecności oraz produkcji dwutlenku węgla (CO_2) rozpuszczonego w podłożu. Jeśli w badanej próbce obecne są drobnoustroje, to w miarę metabolizowania przez nie substratów zawartych w podłożu hodowlanym produkowany jest dwutlenek węgla. Gdy wzrost drobnoustrojów powoduje produkcję CO_2, kolor czujnika przepuszczalnego dla gazu, zamocowanego w dolnej części każdej z butelek hodowlanych, zmienia się na jasnozielony lub żółty. Jaśniejszy kolor zwiększa odbicie światła, co jest monitorowane przez system. Poziom światła odbitego przez butelki podlega monitorowaniu i jest rejestrowany przez urządzenie co 10 minut. W momencie wykrycia ilość jednostek tworzących kolonie (CFUs) na mililitr wynosi 10^6–10^7.

ODCZYNNIKI

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

OSTRZEŻENIE: Podczas stosowania butelki hodowlanej BacT/ALERT MP w systemie wykrywania drobnoustrojów BacT/ALERT należy przedsięwziąć dalsze środki ostrożności, aby zmniejszyć ryzyko przypadkowej ekspozycji na czynniki zakaźne. Zaleca się zdecydowanie, aby urządzenie znajdowało się w laboratorium rutynowo zajmującym się hodowlą *M. tuberculosis*. Do czynności związanych z namnażaniem i pracą z gatunkiem *M. tuberculosis* lub rodzajem *Mycobacterium* hodowanym na podłożach, wymagane jest postępowanie, sprzęt ochronny oraz urządzenia spełniające warunki ochrony biologicznej poziomu 3 (Biosafety Level 3) [9].

BacT/ALERT® MP (oznaczone kolorem czerwonym) – jednorazowe butelki hodowlane BacT/ALERT MP ze zdejmowanym zamknięciem; zawierają 10 ml pożywki oraz wewnętrzny czujnik wykrywający dwutlenek węgla jako wskaźnik wzrostu drobnoustrojów. Butelka hodowlana BacT/ALERT MP może być posiana poprzez jałową strzykawkę z dołączoną igłą z zamkiem bądź igłą w osłonce lub też po zdjęciu zamknięcia, przy użyciu metody bezigłowej.

Pożywka ma następujący skład: bulion Middlebrook 7H9 (0,47% wag./obj.), kazeina trawiona pankreatyną (0,1% wag./obj.), albumina z surowicy wołowej (1,0% wag./obj.), katalaza (48 jedn./ml) w wodzie oczyszczonej. Butelki zawierają 10 ml pożywki i są przygotowywane w atmosferze CO_2, azotu i tlenu pod pompą próżniową. Skład pożywki można dostosowywać w zależności od jej przeznaczenia.

PRZESTROGA: Butelki hodowlane BacT/ALERT zawierają poliwęglan. Nie wszystkie środki dezynfekujące są przeznaczone do stosowania na powierzchniach poliwęglanowych i mogą powodować pogorszenie jakości butelek. Przed zastosowaniem środka dezynfekującego na powierzchnię butelek hodowlanych BacT/ALERT należy sprawdzić jego zgodność z poliwęglanami.

PRZESTROGA: Istnieje możliwość, że niektóre rzadko spotykane i trudne w hodowli mykobakterie nie dadzą się hodować lub będą wolno rosły na pożywce hodowlanej butelek BacT/ALERT MP. W przypadku podejrzenia obecności rzadko spotykanych, trudnych w hodowli mykobakterii, wymagających specjalistycznych pożywek oraz warunków hodowli, należy rozważyć zastosowanie alternatywnych metod namnażania lub dłuższego czasu inkubacji.

PRZESTROGA: W rzadkich przypadkach może się zdarzyć, że mikroorganizmy rosnące na podłożu butelek BacT/ALERT MP nie będą produkować wystarczających ilości dwutlenku węgla dla uzyskania dodatniego wyniku testu. Przykładowo, próbki uzyskane od pacjentów leczonych lekami przeciwgruźliczymi mogą wykazywać słabszy wzrost.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Liofilizowany dodatek zawierający przed poddaniem obróbce amfoterycynę B (0,0180% wag./obj.), azlocylinę (0,0034% wag./obj.), kwas nalidyksowy (0,0400% wag./obj.), polimyksynę B (10 000 jednostek), trimetoprim (0,00105% wag./obj.), wankomycynę (0,0005% wag./obj.) oraz rozcieńczalnik. Skład suplementu może być dostosowany do szczególnych wymagań. Rozpuszczać stosując 10 ml płynu rekonstytucyjnego MB/BacT Reconstitution Fluid.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – kwas oleinowy (0,05% wag./obj.), glicerol (5% wag./obj.), amarant (0,004% wag./obj.) i albumina z surowicy wołowej (1% wag./obj.) w wodzie oczyszczonej. Całkowita objętość butelek wynosi 15 ml. Skład płynu do rekonstytucji może być dostosowany do szczególnych wymagań.

Wymagane dodatkowe materiały

System wykrywania mykobakterii MB/BacT lub BacT/ALERT 3D
Jałowa woda destylowana lub dejonizowana
Bulion Middlebrook 7H11 lub inne podłoże do hodowli mykobakterii na bazie agaru lub jaj
Autoklaw
Sproszkowana N-acetylo-L-cysteina
Jałowy bufor fosforanowy 0,067 M o pH 6,8
Wirówka
Inkubator CO_2, 37°C
Jałowe strzykawki z dołączonymi igłami bądź igłami w osłonkach
Jałowe pipety lub inne jałowe narzędzia do posiewu butelek przy zdjętych zatyczkach
Zamknięcie BacT/ALERT® Reseal dla systemu ze zdejmowalnymi zamknięciami
Środek do dezynfekcji aktywny w stosunku do mykobakterii
Gaziki z alkoholem
Mieszalnik typu worteks
Jałowe stożkowe probówki polipropylenowe do wirowania o pojemności 50 ml
Komora bezpieczeństwa dla materiałów biologicznych
Sterylne jednorazowe rękawice
Jednorazowe fartuchy
Jednorazowe maski
Mikroskop
Materiały do barwienia skrawków
Mikroorganizmy do kontroli jakości

Materiały dostępne w bioMérieux

System wykrywania mykobakterii MB/BacT i systemy wykrywania drobnoustrojów BacT/ALERT

Ostrzeżenia

1. PRÓBKA TESTOWA POTENCJALNIE ZAKAŹNA. Podczas przygotowania oraz przy usuwaniu materiałów zakaźnych należy zachować uniwersalne środki ostrożności.
2. Praca z drobnoustrojami *M. tuberculosis* complex wymaga postępowania, sprzętu ochronnego i urządzeń spełniających warunki ochrony biologicznej poziomu 3 (Biosafety Level 3) [9].
3. Wszystkie posiane butelki hodowlane BacT/ALERT MP, urządzenia do pobierania próbek, strzykawki, pipety oraz inne urządzenia używane do bezigłowego posiewu muszą być odkażone zgodnie z lokalnymi procedurami [2].
4. W razie wycieku lub przecieku może powstać aerozol zawierający mykobakterie (w tym *M. tuberculosis*) lub inne bakterie. Należy postępować z odpowiednimi wytycznymi dotyczącymi bezpieczeństwa dla macierzystej instytucji oraz CDC/NIH [9]. Fenolowe środki odkażające, takie jak Amphyl® są odpowiednimi środkami do zwalczania mykobakterii oraz innych drobnoustrojów.
5. Te butelki hodowlane powinny podlegać utylizacji wyłącznie przez wykwalifikowany personel laboratoryjny.

Sposób przechowywania

Przechowywać butelki hodowlane BacT/ALERT MP oraz preparat MB/BacT Antibiotic Supplement Kit w lodówce (2–8°C). Chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Przed użyciem butelki hodowlane BacT/ALERT MP należy pozostawić do uzyskania temp. pokojowej (na czas 30–60 minut). Na etykiecie każdej butelki wydrukowana jest data ważności. Butelek hodowlanych nie należy używać po upływie ostatniego dnia wskazanego miesiąca.

URZĄDZENIA

Przed użyciem należy zapoznać się z odpowiednim podręcznikiem użytkownika systemu wykrywania drobnoustrojów BacT/ALERT oraz dodatkiem do podręcznika użytkownika systemu MB/BacT.

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Odpowiednie pobieranie próbek, transport, obchodzenie się z próbkami oraz ich przygotowanie są niezmiernie ważne dla dokładności analizy hodowli na obecność gatunków mykobakterii. Pobierać i przygotowywać próbki zgodnie z podręcznikiem procedur mikrobiologicznych Clinical Microbiology Procedures Handbook [10] lub zgodnie z wytycznymi lokalnych podręczników procedur laboratoryjnych. W przypadku przygotowywania niejałowych próbek zalecane jest dekontaminacja z użyciem roztworu N-acetylo-L-cysteiny oraz wodorotlenku sodu.

UWAGA: Firma bioMérieux zaleca, aby ostateczny odczyn próbki stosowanej do posiewu mieścił się w zakresie 6,8–7,2.

POSTĘPOWANIE

1. Przed użyciem butelki hodowlane BacT/ALERT MP należy poddać kontroli pod kątem uszkodzeń lub wad (odbarwienia). Butelki wykazujące objawy uszkodzenia, nieszczelności lub pogorszenia jakości należy wyrzucić. Pożywka powinna być przejrzysta, jednak w temp. poniżej 20°C mogą pojawiać się osady. Nie należy mylić osadów ze zmętnieniem. Nie używać butelki, w której podłoże wykazuje zmętnienie, czujnik ma kolor żółty lub jest nadmierne ciśnienie gazu; są to oznaki możliwego skażenia.
2. Przed użyciem zbadać wzrokowo wszystkie fiolki z płynem rekonstytucyjnym MB/BacT Reconstitution Fluid na obecność śladów uszkodzeń lub skażenia. Fiolki nie należy używać, gdy widoczne są jakiekolwiek ślady pęknięć lub wycieku.
3. Przed użyciem należy wzrokowo ocenić, czy żadna z fiolek z suplementem antybiotykowym MB/BacT nie wykazuje pęknięć lub rozkładu substancji. Nie należy stosować fiolki, w której stwierdzono pęknięcia lubrozkład.
4. Używać strzykawek z zamkiem dla igły lub strzykawek z dołączonymi igłami w osłonce, gdy zatyczka jest zdejmowana w celuposiewu.
5. Zawsze przenosić posiane butelki w stelażu lub w koszu.

Przygotowanie MB/BacT Antibiotic Supplement

Przed użyciem dodać z zachowaniem zasad aseptyki 10 ml płynu rekonstytucyjnego MB/BacT Reconstitution Fluid do każdej fiolki zawierającej preparat MB/BacT Antibiotic Supplement wymagany do wykonania testu. Pozostawić do rozpuszczenia. Poruszyć delikatnie w celu wymieszania zawartości.

UWAGI:
- Jedna fiolka rozcieńczonego preparatu MB/BacT Antibiotic Supplement wystarcza na 20 butelek hodowlanych BacT/ALERT MP.
- Rozpuszczony suplement antybiotykowy MB/BacT może być przechowywany do 7 dni w temperaturze 2–8°C. Należy zapisać datę ważności rozpuszczonego suplementu na etykiecie fiolki.
- Pozostały płyn rekonstytucyjny można przechowywać w temp. 2–8°C do późniejszego użycia z jałowymi próbkami.

Przygotowanie butelek i posiew

UWAGA: W celu uniknięcia skażenia należy zachować ostrożność, zarówno podczas przygotowywania butelek, jak i przy posiewie próbki.

1. Na każdą butelkę hodowlaną BacT/ALERT MP nakleić etykietę z odpowiednimi danymi pacjenta. Ikony na etykiecie butelki (☺,#,◷) mogą być definiowane przez użytkownika. Przed posiewembutelki należy pozostawić do uzyskania temp. pokojowej (30–60 minut).
2. Odkazić zatyczkę gazikiem z alkoholem lub jego odpowiednikiem. Przed dodaniem do butelki rozpuszczonego suplementu antybiotykowego lub płynu do rekonstytucji odczekać aż zatyczka wyschnie.
3. Przed posiewem dodać z zachowaniem zasad aseptyki 0,5 ml rozpuszczonego preparatu MB/BacT Antibiotic Supplement do każdej z butelek hodowlanych BacT/ALERT MP przeznaczonej do hodowli próbek niejałowych, lub 0,5 ml samego płynu MB/BacT Reconstitution Fluid do każdej z butelek hodowlanych BacT/ALERT przeznaczonej do hodowli próbek jałowych. Płyn MB/BacT Reconstitution Fluid zawiera składniki niezbędne do zapewnienia optymalnego wzrostu mykobakterii obecnych w próbkach.
   a. Przenieść z zachowaniem zasad aseptyki rozpuszczony suplement antybiotykowy lub płyn do rekonstytucji do każdej z butelek hodowlanych BacT/ALERT MP.
   b. Różowy odcień podłoża oznacza, że z powodzeniem dodano suplement lub płyn do rekonstytucji.

UWAGA: Następujące czynności należy wykonywać w komorze bezpieczeństwa dla materiałów biologicznych, używając odpowiedniej odzieży ochronnej, zgodnie ze standardami bezpieczeństwa ustalonymi przez CDC/NIH dla wytycznych bezpieczeństwa biologicznego stopnia 3 [9].

Posiew przy użyciu bezpiecznych igieł

1. Pobierać próbki poddanego obróbce lub sterylnego materiału przy użyciu strzykawki z dołączoną igłą z zamkiem lub igłą z osłonką i zachowując aseptyczność przenieść 0,5 ml do odpowiednio oznaczonej butelki hodowlanej BacT/ALERT MP. Wentylacja nie jest wymagana. Zaleca się jednoczesny posiew konwencjonalnego podłoża stałego. Pozostałą część poddanej obróbce próbki można zachować w lodówce (w temperaturze 2–8°C) do późniejszego użycia.
2. Przetrzeć górną część butelki gazikiem nasączonym roztworem 2% Amphyl (lub innego zatwierdzonego mykobakterioczego preparatu dezynfekcyjnego). Przed wyjęciem z komory bezpieczeństwa dla materiałów biologicznych pozostawić do wyschnięcia.
3. Należy dopilnować, aby doszło do właściwego wymieszania odczynników i próbki w butelce BacT/ALERT MP.

Posiew przy użyciu urządzeń bezigłowych

Uwaga: W celu uniknięcia skażenia należy zachować ostrożność, zarówno podczas przygotowywania butelek, jak i przy posiewie próbki materiału.

1. Przy posiewie z użyciem aseptycznej techniki bezigłowej, po dodaniu w sposób jałowy suplementu antybiotykowego lub płynu do rekonstytucji do butelki, należy postępować według poniższej instrukcji, jak opisano w ulotce dołączonej do opakowania.
2. Usunąć plombę metalową przez pociągnięcie za pasek przebiegający przez plombę do jej krawędzi. Unikać całkowitego oderwania paska środkowego od plomby. Kontynuować odrywanie paska dookoła butelki w celu całkowitego oderwania plomby od butelki.

   PRZESTROGA: Zachować ostrożność przy odrywaniu metalowej plomby. Jeśli pasek ulegnie oderwaniu od plomby i powstaną ostre krawędzie, nie próbować ręcznego odrywania plomby. Zamiast tego użyć pęsety lub innego narzędzia.
3. Po oderwaniu metalowej plomby usunąć zatyczkę zachowując aseptyczność. Usunięcie zatyczki może być łatwiejsze, jeśli odegnie się ją w kierunku od butelki po obu stronach.
4. Posiewać butelkę próbką w sposób jałowy przy zastosowaniu urządzenia bezigłowego.
5. Zachowując warunki aseptyczne umieścić zatyczkę z powrotem na butelce i sprawdzić, czy została ona całkowicie włożona do otworu. Umieścić zamknięcie (BacT/ALERT® Reseal) na korku oraz otworze butelki. Zamknięcie Reseal musi objąć dolną krawędź butelki, a jego wewnętrzna strona powinna ściśle przylegać do górnej powierzchni zatyczki. Zamknięcie Reseal powinno ciasno obejmować butelkę.
6. Należy dopilnować, aby doszło do właściwego wymieszania odczynników i próbki w butelce BacT/ALERT MP.

Procedura badania

1. Włożyć posiane butelki hodowlane BacT/ALERT MP do urządzenia MB/BacT lub BacT/ALERT 3D stosując się do procedury zamieszczonej w odpowiednim podręczniku użytkownika.
2. Po włożeniu butelek do urządzenia powinny one pozostać w nim przez 42 dni lub do momentu oznaczenia ich jako dodatnich.
3. Gdy urządzenie wskazuje obecność butelki z wynikiem dodatnim, należy wyjąć butelkę zgodnie z procedurą opisaną w podręczniku użytkownika BacT/ALERT.
4. Ze wszystkich butelek oznaczonych jako dodatnie należy wykonać preparaty oraz dodatkowe przesiewy na obecność pałeczek kwasoopornych. Przesiewy można wykonywać przez pobranie próbki igłą i strzykawką z butelek bez zamknięcia Reseal lub z butelek z zamknięciem Reseal.
   a. **Wykonywanie przesiewów z butelek z wynikiem dodatnim bez zamknięcia Reseal przy użyciu igły i strzykawki.** W komorze bezpieczeństwa dla materiałów biologicznych zamieszać zawartość butelki, odkazić korek i pobrać próbkę do barwienia na mykobakterie kwasooporne oraz wykonania przesiewu. Po wykonaniu przesiewu odkazić korek butelki.
   b. **Przesiewy z butelek z wynikiem dodatnim zabezpieczonych zamknięciem Reseal.** Pociągnąć centralny pasek zamknięcia Reseal i całkowicie usunąć plombę z butelki. Po wyjęciu korka można pobrać próbkę w sposób jałowy. Jeśli wymagane jest przechowanie butelki do dalszych badań, ponownie założyć korek w sposób aseptyczny i umieścić nowe zamknięcie Reseal na korku i butelce.

   Jeśli wynik preparatu w kierunku bakterii kwasoopornych jest dodatni, wykonać specjalne procedury identyfikacji mykobakterii używane w Państwa instytucji. Jeśli preparat jest ujemny dla pałeczek kwasoopornych, należy wykonać barwienie metodą Grama. Jeśli zarówno preparaty w kierunku bakterii kwasoopornych, jak i barwiony metodą Grama są ujemne, co wskazuje na możliwy wynik fałszywie dodatni, butelkę należy włożyć ponownie do urządzenia do chwili uzyskania wzrostu przesianego materiału bądź ponownego oznaczenia jako wynik dodatni lub ujemny. Z materiału hodowli z wynikiem początkowym fałszywie dodatnim oraz ponownie oznaczonego jako dodatni, należy wykonać preparat i posiew.
5. Jeśli w preparacie barwionym metodą Grama stwierdza się obecność drobnoustrojów innych niż mykobakterie, należy ponownie poddać całą zawartość butelki kolejnej procedurze dekontaminacji i posiać inną butelkę hodowlaną BacT/ALERT MP, bądź wyrzucić i pobrać inną próbkę do hodowli. Jeśli w nowej butelce hodowlanej BacT/ALERT MP ponownie dojdzie do wzrostu drobnoustrojów innych niż mykobakterie, należy wyrzucić próbkę i pobrać nową w celu jej hodowli.
6. Próbki ujemne zasygnalizowane po upływie maksymalnego czasu badania należy oceniać wzrokowo na obecność zmętnienia. Jeśli zawartość butelki wykazuje zmętnienie, pobrać w sposób jałowy próbkę do barwienia na bakterie kwasooporne i wykonać przesiew zgodnie z wytycznymi Państwa laboratorium. Butelki nie wykazujące zmętnienia można wyrzucić. Przed wyrzuceniem wszystkie butelki należy poddać sterylizacji.
7. Procedury wkładania oraz wyjmowania butelek hodowlanych z urządzeń MB/BacT lub BacT/ALERT 3D podano w podręczniku użytkownika.
8. **Nie należy ponownie używać butelek hodowlanych BacT/ALERT.** Należy utylizować posiane butelki hodowlane BacT/ALERT zgodnie z protokołem postępowania danego laboratorium. Stosowne jest poddawanie posianych butelek BacT/ALERT działaniu autoklawu lub spaleniu [9].

WYNIKI

Butelki hodowlane z wynikiem dodatnim lub ujemnym oznaczane są przez oprogramowanie decyzyjne zawarte w systemach detekcji mykobakterii MB/BacT lub BacT/ALERT 3D. Do chwili zasygnalizowania przez urządzenie butelek z wynikiem dodatnim lub ujemnym nie są wymagane żadne czynności.

RAPORTY Z WYNIKAMI

Wyniki	Raport
Sygnał +/ Preparat w kierunku AFB (pałeczek kwasoopornych) +	Wzrost dodatni pałeczek kwasoopornych; identyfikacja w toku
Sygnał +/ Preparat w kierunku AFB (pałeczek kwasoopornych) –	Brak raportu; lub próbka zanieczyszczona mikroorganizmami innymi niż mykobakterie; niemożliwe oznaczenie obecności / nieobecności pałeczek kwasoopornych (AFB)

Raport zawiera wyniki wstępne tylko wówczas, gdy wykonano barwienie na pałeczki kwasooporne.

KONTROLA JAKOŚCI

Każde opakowanie butelek hodowlanych BacT/ALERT MP zawiera świadectwo zgodności, oznaczające satysfakcjonujący wzrost *M. tuberculosis* ATCC 25177 oraz *M. intracellulare* ATCC 13950. Przy odbiorze nowych serii lub dostaw butelki hodowlane BacT/ALERT MP lub odczynniki mogą być poddane kontroli jakości. Odpowiednie organizmy do przeprowadzenia kontroli jakości opisane są w dokumencie CLSI/NCCLS M22-A3. Należy postępować zgodnie z procedurą przygotowania i posiewu butelek:

1. Dodać 0,5 ml rozpuszczonego preparatu MB/BacT Antibiotic Supplement do każdej z butelek hodowlanych BacT/ALERT MP przeznaczonych do przetestowania.
2. Do wybranych butelek posiać po 0,5 ml szczepów kontrolnych, rozcieńczonych do 10^4 CFU/ml w jałowym roztworze soli fizjologicznej lub jałowym bulionie Middlebrook 7H9 bez suplementu (z zatwierdzonej serii).
3. Po uzyskaniu oczekiwanych wyników używać pozostałych butelek do badania próbek klinicznych. W przypadku nieuzyskania spodziewanych wyników, skontaktować się z Działem Obsługi Klienta bioMérieux.

Urządzenie

Do każdego urządzenia dodano zestaw standardów odbijania światła BacT/ALERT dla celów kontroli jakości oraz kalibracji. Wszystkie procedury kontroli jakości powinny wchodzić w skład normalnych czynności konserwacyjnych systemu. Więcej informacji można znaleźć w instrukcji obsługi urządzenia BacT/ALERT.

OGRANICZENIA TESTU

Wielu zmiennych związanych z badaniem posiewów w kierunku mykobakterii nie można w praktyce kontrolować tak, aby mieć całkowitą pewność, że otrzymane wyniki zależą wyłącznie od prawidłowego lub nieprawidłowego działania danego podłoża hodowlanego albo systemu detekcji.

1. Hodowle zakładane dla uzyskania pierwotnego rozpoznania, po włączeniu leczenia, przeciwbakteryjnego mogą dawać wyniki ujemne.
2. Wzrost mykobakterii w butelkach BacT/ALERT MP zależy od jakości pobranej próbki, liczby hodowanych mikroorganizmów w objętości próbki oraz sposobu przygotowania próbki. Przestrzeganie instrukcji proceduralnych jest niezmiernie istotne dla optymalnego wzrostu mykobakterii.
3. Liczba mikroorganizmów jest często niewielka. Zwykle zaleca się pobieranie próbek przez trzy kolejne dni.
4. Nieprawidłowe przygotowanie/dekontaminacja lub opóźnienia w transporcie próbek mogą powodować nadmierny wzrost bakterii, co może prowadzić do zanieczyszczenia hodowli bulionowej. Nawet gdy w próbce po przygotowaniu obecna jest tylko jedna zdolna do życia komórka bakteryjna, całe podłoże hodowlane może ulec zanieczyszczeniu.
5. Można spotkać powodujące skażenie mikroorganizmy oporne na antybiotyki zawarte w suplemencie antybiotykowym MB/BacT.
6. Ocena morfologii i zabarwienia kolonii powinna być przeprowadzana wyłącznie na podłożach stałych.
7. Butelki hodowlane BacT/ALERT MP z wynikiem dodatnim mogą zawierać jeden lub więcej gatunków mykobakterii oraz/lub gatunków innych niż mykobakterie. W mieszanych hodowlach bulionowych mykobakterii mikroorganizm o wolniejszym tempie wzrostu może zostać wyparty z hodowli na skutek konkurencji ze strony mikroorganizmu szybciej rosnącego lub hodowla może zostać wyrzucona po wykryciu mikroorganizmu rosnącego szybciej. Identyfikacja obecności mykobakterii wymaga wykonania przesiewu oraz dodatkowych procedur identyfikacji mikroorganizmów. Nie ustalono dotąd zgodności morfologii mikroskopowej w butelkach hodowlanych BacT/ALERT MP.
8. Zanieczyszczenie mykobakteriami saprofitycznymi w wodzie wodociągowej lub innych odczynnikach laboratoryjnych czy urządzeniach może być przyczyną wyników „klinicznie" fałszywie dodatnich (wzrost mykobakterii nie w próbce klinicznej).
9. Zaleca się dekontaminację przy użyciu metody z N-acetylo-L-cysteiną oraz wodorotlenkiem sodu. Inne metody odkażania nie były badane w połączeniu z podłożem hodowlanym BacT/ALERT MP. Środki odkażające o działaniu trawiącym mogą wpływać szkodliwie na mykobakterie.
10. Mykobakterie mogą różnić się kwasoopornością w zależności od szczepu, wieku hodowli oraz innych zmiennych. Ze wszystkich butelek BacT/ALERT MP z dodatnim sygnałem lub wyglądających na mętne należy wykonać posiewy, zarówno na podłoża wybiórcze dla mykobakterii, jak i niewybiórcze. Gatunki inne niż mykobakterie mogą stłumić wzrost mykobakterii. Takie butelki hodowlane należy odkazić i ponownie wykonać posiew.
11. Butelki hodowlane BacT/ALERT MP inkubowane są w temp. 35°C z wyłączeniem mykobakterii wymagających do wzrostu innych temperatur inkubacji (np. *M. marinum, M. ulcerans* i *M. haemophilum*). Wzrost takich mikroorganizmów wymaga zastosowania dodatkowych metod hodowli. Organizmy o szczególnych wymaganiach (np. *M. haemophilum*) mogą nie zostać wyhodowane w butelkach BacT/ALERT MP, nawet gdy są inkubowane w odpowiedniej temperaturze. W badaniach analitycznych otrzymano następujące izolaty: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* oraz *M. xenopi*. Możliwość wykrycia w butelkach BacT/ALERT MP innych, rzadziej występujących izolatów nie jest znana.
12. Trudno jest wykonać przy użyciu bezpiecznych igieł i strzykawek posiewu rozdrobnionych próbek tkanek do butelek hodowlanych BacT/ALERT MP. Aby posiew był prawidłowy, próbki tkankowe muszą być dostatecznie rozdrobnione, w celu uzyskania właściwego inokulum w butelkach BacT/ALERT MP. Dodatkowo, korzystne może być użycie bezpiecznych igieł o szerszym świetle, lub zdjęcie zdejmowalnego zamknięcia, dodanie w sposób jałowy rozdrobnionej próbki i nałożenie zamknięcia Reseal na butelkę hodowlaną BacT/ALERT MP. Jeśli podejrzewa się kontaminację próbek rozdrobnionych tkanek, należy je odkazić i poddać obróbce przed dodaniem do butelek BacT/ALERT MP. Zapewni to uzyskanie maksymalnego wzrostu mykobakterii, które mogą znajdować się w próbce.
13. Przedłużona inkubacja lub dodatek preparatu Mycobactin J mogą być konieczne w przypadku podejrzenia obecności *M. malmoense* lub *M. genavense*. Drobnoustroje z gatunków *M. malmoense* i *M. genavense* wymagają przedłużonej inkubacji przez czas przekraczający normalne okresy stosowane przez wiele laboratoriów w USA [2].
14. Suplement antybiotykowy, pomimo że jest niezbędny w badaniu większości próbek, może hamować wzrost niektórych mykobakterii.
15. Wskaźnik wyników fałszywie ujemnych w badaniach klinicznych prowadzonych przez firmę bioMérieux wynosił 0,2%.

CHARAKTERYSTYKA TESTU

Wykonywano badania posiewów przy użyciu następujących mikroorganizmów w stężeniach ≤ 10^6 CFU/butelkę oraz ≤ 10^2 CFU/butelkę.

Mikroorganizm	Posiew (CFU/butelkę)	Czas do wykrycia (dni) [1] BacT/ALERT MP (Plastikowa)
Kompleks TB		
M. tuberculosis (4 szczepy)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 szczepy)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotochromogenne (Runyoun I)		
M. kansasii (2 szczepy)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Skotochromogenne (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 szczepy)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 szczepy)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Niechromogenne (Runyoun III)		
M. avium (4 szczepy)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 szczepy)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Szybkorosnące (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 szczepy)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Każdy mikroorganizm badano z zastosowaniem preparatu MB/BacT Antibiotic Supplement. Badanie wykonywano dla pojedynczych butelek przy ≤ 10^6 oraz trzykrotnie przy ≤ 10^2. Wymienione dane reprezentują zakres wartości dla wielu szczepów oprócz *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* i *M. chelonae*, gdzie podano wartości dla poszczególnych drobnoustrojów.

[2] Jedna z trzech butelek wykazywała brak wzrostu po 42 dniach; wartość podana jest średnią dla dwóch butelek.

[3] Jeden mikroorganizm nie wykazywał wzrostu w trzech z trzech butelek po 42 dniach.

PIŚMIENNICTWO

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

ASORTYMENT

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	Opakowanie po 100 sztuk	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	Zestaw po 100 testów	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	Zestaw po 5 fiolek	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	Zestaw po 5 fiolek	
BacT/ALERT® Reseal	Pudełko po 100 sztuk	REF 259787

W celu uzyskania pomocy technicznej w USA, należy kontaktować się z biurem obsługi klienta bioMérieux pod numerem 1-800-682-2666. Poza USA kontaktować się z lokalnym przedstawicielstwem bioMérieux.

bioMérieux, niebieskie logo oraz BacT/ALERT są używanymi, zgłoszonymi i/lub zarejestrowanymi znakami towarowymi należącymi do firmy bioMérieux SA lub jednej z jej filii.

Amphyl jest zastrzeżonym znakiem handlowym Linden Corporation.

ATCC jest zarejestrowanym znakiem towarowym American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

CE

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Lipiec 2008

BacT/ALERT® MP

PORTUGUÊS

43-03064

INDICAÇÃO DE SECÇÃO REVISTA

Guardar entre 2° e 8° C num local ao abrigo da luz solar directa.

Consulte o quadro de símbolos no final do folheto.

APLICAÇÃO

O Sistema BacT/ALERT® MP é composto pelo frasco de cultura BacT/ALERT MP com uma tampa de protecção amovível utilizado em conjunto com o suplemento de antibiótico MB/BacT® (e/ou com o líquido de reconstituição MB/BacT). O Sistema BacT/ALERT MP foi concebido para ser utilizado com o Sistema de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT® 3D para isolamento e detecção de micobactérias em amostras corporais estéreis que não sejam sangue e em amostras clínicas digeridas-descontaminadas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A tuberculose continua a ser um grande problema de saúde pública global. A Organização Mundial de Saúde estima que 9 milhões de novos casos e 2 milhões de mortes são directamente atribuídos à doença, todos os anos.[1] A tuberculose é tida como a principal causa de morte em muitos países pobres e em vias de desenvolvimento.[2] Nos Estados Unidos, o número de novos casos apresentados ao CDC atingiu um máximo em 1992.[2,3] Desde então, houve um declínio consistente e substancial dos casos declarados anualmente nos Estados Unidos, principalmente devido à implementação de medidas de prevenção e controlo entre 1989 e 1993.[2] No entanto, há ainda um aumento significativo no número de casos em alguns grupos populacionais, especialmente entre pessoas nascidas fora dos Estados Unidos e seus territórios. As infecções causadas por microrganismos do complexo *M. tuberculosis* são normalmente pulmonares.

As micobactérias além do bacilo da tuberculose (MOTT) são referidos aqui como micobactérias não-tuberculosas (NTM). A maioria destes isolamentos requer uma incubação entre 35° a 37° C, salvo indicação em contrário. Estes microrganismos encontram-se normalmente no solo e na água, e têm sido implicados como patogénios oportunistas em doentes com doenças pulmonares subjacentes, imunossupressão ou trauma percutâneo.[4] As NTM associadas a doença pulmonar são: *o complexo M. avium* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, complexo M. fortuitum, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* e *M. xenopi* (temperatura óptima de 42° C). *M. marinum* e *M. ulcerans*, que requerem uma incubação a 30° C, são NTM associadas a infecções cutâneas. As NTM que produzem outros tipos de infecção (p. ex., doença disseminada, linfadenite, etc.) são: MAC, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, complexo *M. fortuitum* (os isolados de *M. chelonae* podem necessitar de uma incubação a 30° C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* e *M. haemophilum* (requerem a adição de hemina e uma incubação a 30° C).[2]

As micobactérias são bacilos ácido-álcool-resistentes aeróbios, não formadores de esporos e sem mobilidade, que apresentam velocidades de crescimento lentas ou muito lentas; o tempo de geração das espécies varia de 2 a >20 h, dependendo da espécie.[2] O crescimento da *M. tuberculosis* utilizando os meios para micobactérias tradicionais pode demorar duas a oito semanas ou mais.[5] As recomendações do CDC sugerem que seja utilizado um meio de cultura líquido, juntamente com um meio sólido, para a cultura primária.[6,7] O método de cultura líquida é necessário para conseguir uma detecção, crescimento e resultados de sensibilidade mais rápidos para o *M. tuberculosis*.[7]

Os Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT e BacT/ALERT 3D, utilizados em conjunto com o Sistema BacT/ALERT MP, fornecem tanto um sistema de detecção microbiano como um meio de cultura com condições nutricionais e ambientais adequadas para recuperar as espécies micobacterianas normalmente isoladas de amostras de doentes que não sejam amostras de sangue. O suplemento antibiótico MB/BacT pretende reduzir a incidência de contaminação interferente devido a bactérias que possam sobreviver ao processo de descontaminação/concentração. O suplemento antibiótico MB/BacT deve ser adicionado aos frascos de BacT/ALERT MP antes da inoculação de todas as amostras não estéreis. Para recuperação das micobactérias presentes nas amostras estéreis, só deve adicionar-se líquido de reconstituição aos frascos BacT/ALERT MP. O líquido de reconstituição MB/BacT contém os componentes necessários para assegurar um crescimento óptimo das micobactérias presentes na amostra do doente. Os frascos inoculados são colocados no aparelho onde são incubados e continuamente monitorizados quanto à presença de micobactérias que irão crescer no frasco de cultura BacT/ALERT MP.

PRINCÍPIO DO TESTE

Os Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT e BacT/ALERT 3D utilizam os mesmos princípios para detectar microrganismos em culturas micobacterianas, tal como descrito para o Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® no que se refere a hemoculturas.[8] Os Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT e BacT/ALERT 3D utilizam um sensor colorimétrico e a reflexão de luz para monitorizar a presença e a produção de dióxido de carbono (CO_2) dissolvido no meio de cultura. Se existirem microrganismos na amostra testada é produzido dióxido de carbono, uma vez que os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura. Se o crescimento dos microrganismos produzir CO_2, a cor do sensor permeável a gás, instalado no fundo de cada frasco de cultura, muda para amarelo ou verde mais claro. As cores mais claras resultam num aumento das unidades de reflectância monitorizadas pelo sistema. A reflectância do frasco é monitorizada e registada pelo aparelho de 10 em 10 minutos. Na altura da detecção, o número aproximado de unidades formadoras de colónias (UFC) por ml é 10^6-10^7.

REAGENTES

Para diagnóstico *in vitro*.

AVISO: Para reduzir os riscos de exposição acidental a agentes infecciosos, devem ser tomadas precauções adicionais ao utilizar o frasco de cultura BacT/ALERT MP no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT. Recomenda-se vivamente que o aparelho seja colocado num laboratório utilizado para a cultura de rotina de *M. tuberculosis.* Em relação às actividades que envolvem a propagação e manipulação de *M. tuberculosis* ou de *Mycobacterium sp.* que tenham crescido em cultura, recomenda-se que estas sejam manipuladas em salas de contenção biológica de nível 3, no interior de câmaras de segurança biológica.[9]

BacT/ALERT® MP (codificado com a cor vermelha) – frascos de cultura descartáveis BacT/ALERT MP com uma tampa de protecção amovível, contendo 10 ml de meio e um sensor interno que detecta o dióxido de carbono como indicador de crescimento microbiano. O frasco de cultura BacT/ALERT MP pode ser inoculado através de uma seringa estéril com bloqueio de agulha ou com uma agulha com bainha adaptada, ou removendo as tampas de protecção e utilizando um dispositivo de inoculação sem agulha.

A formulação do meio consiste em: meio líquido Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), caseína de digestão pancreática (0,1% p/v), albumina de soro de bovino (1,0% p/v), catalase (48 u/ml) em água destilada. Os frascos contêm 10 ml de meio e são preparados com uma atmosfera de CO_2, nitrogénio e oxigénio sob vácuo. A composição do meio pode ser ajustada para satisfazer requisitos específicos de comportamento funcional.

PRECAUÇÃO: os frascos de cultura BacT/ALERT contêm policarbonato. Nem todos os desinfectantes são concebidos para serem utilizados em superfícies de policarbonato e podem deteriorar o frasco. Verifique a compatibilidade do desinfectante com policarbonato antes de o utilizar nas superfícies dos frascos de cultura BacT/ALERT.

PRECAUÇÃO: é possível que algumas micobactérias raras e de crescimento lento não cresçam ou cresçam lentamente no meio de crescimento do frasco de cultura BacT/ALERT MP. Se suspeitar da existência de micobactérias raras e de crescimento lento, que precisem de condições de meios e de cultura específicas, deve considerar métodos alternativos ou um tempo de incubação prolongado como meio de recuperação.

PRECAUÇÃO: em raras ocasiões podem encontrar-se microrganismos que crescem no meio de crescimento do frasco de cultura BacT/ALERT MP, mas não produzem dióxido de carbono suficiente para ser determinado positivo. Por exemplo, as amostras de doentes que se encontram em tratamento com agentes antimicobacterianos podem apresentar o crescimento comprometido.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Suplemento liofilizado formulado para conter anfotericina B (0,0180% p/v), azlocilina (0,0034% p/v), ácido nalidíxico (0,0400% p/v), polimixina B (10 000 unidades), trimetoprim (0,00105% p/v), vancomicina (0,0005% p/v) e um agente espessante antes do processamento. A composição do suplemento pode ser ajustada para ir ao encontro de requisitos de comportamento funcional específicos. Reconstituir com 10 ml de líquido de reconstituição MB/BacT.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Ácido oleico (0,05% p/v), glicerol (5% p/v), amaranto (0,004% p/v) e albumina de soro de bovino (1% p/v) em água destilada. Os frascos contêm um volume de enchimento total de 15 ml cada. A composição do líquido de reconstituição pode ser ajustada para ir ao encontro de requisitos de comportamento funcional específicos.

Materiais adicionais necessários

Sistema de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT 3D
Água desionizada ou destilada estéril
Middlebrook 7H11 ou outro meio de gelose micobacteriano ou à base de ovo
Autoclave
N-acetil-L-cisteína em pó
Tampão fosfato estéril 0,067 M, pH 6,8
Centrífuga
Incubadora de CO_2, a 37° C
Seringas estéreis com agulhas com bloqueio ou agulhas com bainha adaptada
Pipetas estéreis ou outros dispositivos de inoculação sem agulha estéreis para frascos com as tampas de protecção retiradas
Vedante BacT/ALERT® Reseal para as tampas de protecção amovíveis
Desinfectante micobactericida
Zaragatoas com álcool
Agitador vortex
Tubos de centrífuga cónicos em propileno estéreis, de 50 ml
Câmara de segurança biológica
Luvas estéreis, descartáveis
Batas descartáveis
Máscaras descartáveis
Microscópio
Materiais para coloração de lâminas
Organismos para Controlo de Qualidade

Materiais disponíveis junto da bioMérieux

Sistema de Detecção de Micobactérias MB/BacT e Sistemas de Detecção Microbiana BacT/ALERT

Precauções

1. AMOSTRAS DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSAS. Ter em atenção as Precauções Universais quando manipular e eliminar materiais infecciosos.
2. Trabalhar com microrganismos do complexo *M. tuberculosis* que tenham crescido em cultura exige a utilização de técnicas, equipamento de contenção e instalações de nível 3 de segurança biológica.[9]
3. Todos os frascos de cultura BacT/ALERT MP inoculados, dispositivos de colheita de amostras, seringas, pipetas ou outros dispositivos de inoculação sem agulha utilizados para a inoculação devem ser descontaminados em conformidade com as regulamentações aplicáveis.[2]
4. Em caso de derrame ou dispersão, é possível que seja produzido um aerossol de micobactérias (incluindo a *M. tuberculosis*) ou de outras bactérias. Siga as instruções de orientação de segurança específicas da sua própria instituição e as do CDC/NIH.[9] Os desinfectantes fenólicos, como o Amphyl®, são agentes apropriados para descontaminação de micobactérias e de outros microrganismos.
5. Estes frascos de cultura devem ser utilizados apenas por técnicos de laboratório experientes.

Instruções de armazenamento

Os frascos de cultura BacT/ALERT MP e suplemento de antibiótico MB/BacT devem ser armazenados no frigorífico (2° a 8° C). Proteger da luz solar directa. Deve permitir que os frascos de cultura BacT/ALERT MP atinjam a temperatura ambiente (30-60 minutos) antes de os utilizar. Nas etiquetas dos frascos está impresso o prazo de validade. Não utilizar os frascos de cultura para além do último dia do mês indicado na etiqueta.

APARELHOS

Consultar o Manual do Utilizador do Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT apropriado e o Suplemento do Manual do Utilizador do MB/BacT antes de utilizar.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A colheita, o transporte, a manipulação e a preparação correctos da amostra são extremamente importantes para a análise precisa das culturas dos doentes para as espécies micobacterianas que possam estar presentes. Recolha e processe as amostras de acordo com o Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] ou tal como definido no manual de procedimentos do seu laboratório. É recomendada a descontaminação por N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio para processamento de amostras não estéreis.

NOTA: a bioMérieux recomenda que o pH final da amostra do inóculo se situe entre os 6,8 e 7,2.

PROCEDIMENTOS

1. Antes de utilizar os frascos de cultura BacT/ALERT MP, estes devem ser inspeccionados visualmente quanto à existência de vestígios de danos ou deterioração (descoloração). Os frascos que apresentem sinais de danos, dispersão ou deterioração devem ser eliminados. O meio deve estar límpido, mas poderão formar-se precipitados a temperaturas inferiores a 20° C. Não confundir precipitação com turvação. Não utilize um frasco cujo meio apresente turvação, um sensor amarelo ou excesso de pressão gasosa, pois tais características são indícios de possível contaminação.
2. Antes de utilizar, inspeccionar visualmente todos os frascos de líquido de reconstituição MB/BacT, verificando se existem vestígios de danos ou contaminação. Se existir algum vestígio de rachas ou fugas, o frasco não deverá ser utilizado.
3. Antes de utilizar, inspeccionar visualmente todos os frascos de Suplemento antibiótico MB/BacT, verificando se existem vestígios de rachas ou degradação no desidratado. Se existirem vestígios de fissuras ou degradação, o frasco não deverá ser utilizado.
4. Utilizar seringas com bloqueio de agulha ou seringas com agulhas com bainha adaptadas quando a tampa de protecção não tiver sido retirada para a inoculação.
5. Transportar sempre os frascos inoculados num suporte ou cesto.

Preparação do suplemento de antibiótico MB/BacT

Antes de utilizar, adicionar assepticamente 10 ml de líquido de reconstituição MB/BacT a cada frasco de suplemento de antibiótico MB/BacT necessário para o teste. Deixar o desidratado dissolver. Agitar suavemente para misturar o conteúdo.

NOTAS:
- Um frasco de suplemento de antibiótico MB/BacT reconstituído é suficiente para 20 frascos de cultura BacT/ALERT MP.
- Depois de reconstituído, o suplemento de antibiótico MB/BacT tem uma duração de 7 dias quando conservado entre 2° e 8° C. A data de validade para o suplemento reconstituído deve ser registada na etiqueta do frasco.
- O restante líquido de reconstituição pode ser conservado entre 2° e 8° C para ser utilizado mais tarde com amostras estéreis.

Preparação e inoculação do frasco

NOTA: ter cuidado para evitar a contaminação durante a preparação e inoculação dos frascos com a amostra do doente.

1. Rotular cada frasco de cultura BacT/ALERT MP com as informações apropriadas do doente. Os ícones na etiqueta do frasco (☺,#,◷) podem ser definidos pelo utilizador. Os frascos devem estar à temperatura ambiente (30 a 60 minutos) antes da inoculação.
2. Desinfectar a rolha com algodão embebido em álcool ou equivalente. Deixar a rolha secar antes de adicionar o suplemento de antibiótico reconstituído ou o líquido de reconstituição ao frasco.
3. Antes da inoculação, adicione assepticamente 0,5 ml de suplemento de antibiótico reconstituído MB/BacT a cada frasco de cultura BacT/ALERT MP a ser utilizado para a cultura de amostras não estéreis ou apenas 0,5 ml de líquido de reconstituição MB/BacT a cada frasco de cultura BacT/ALERT a ser utilizado para a cultura de amostras estéreis. O líquido de reconstituição MB/BacT contém componentes necessários para assegurar um crescimento óptimo das micobactérias presentes na amostra do doente.
   a. Transfira assepticamente o suplemento de antibiótico reconstituído ou o líquido de reconstituição para cada frasco de cultura BacT/ALERT MP.
   b. Uma cor rosada no meio indicará que o suplemento ou o líquido de reconstituição foram adicionados com sucesso.

NOTA: as seguintes etapas devem ser efectuadas numa câmara de segurança biológica e utilizando vestuário de protecção adequado em conformidade com as normas de segurança definidas pelo CDC/NIH referentes às precauções de segurança do Nível 3 de Segurança Biológica.[9]

Inoculação utilizando agulhas de segurança

1. Obter cada amostra processada ou estéril do doente utilizando uma seringa com uma agulha com fixação adaptada ou uma agulha com bainha e transfira 0,5 ml assepticamente para dentro do frasco de cultura BacT/ALERT MP correctamente rotulado. Não é necessário ventilar. É recomendada a inoculação concomitante de um meio sólido convencional. A restante amostra processada pode ser conservada no frigorífico (2° a 8° C) para ser posteriormente utilizada.
2. Limpar a parte de cima dos frascos com uma gaze embebida em 2% de Amphyl (ou outro desinfectante tuberculicida aprovado). Deixar secar antes de os remover da câmara de segurança biológica.
3. Assegurar uma mistura adequada dos reagentes e da amostra no frasco BacT/ALERT MP.

Inoculação utilizando dispositivos sem agulhas

Nota: ter cuidado para evitar a contaminação durante a preparação e inoculação dos frascos com a amostra do doente.

1. Se escolher utilizar a inoculação asséptica sem agulhas, seguir as instruções seguintes depois de adicionar assepticamente o suplemento de antibiótico ou o líquido de reconstituição ao frasco, conforme é descrito neste folheto informativo.
2. Retirar o selo metálico puxando pela patilha central ao longo do topo, e para baixo e ao longo do aro do selo. Evitar retirar completamente a patilha central do selo. Continuar a puxar a patilha em volta do frasco para retirar todo o selo do frasco.

   PRECAUÇÃO: ter cuidado quando retirar o selo da tampa de metal. Se a patilha de puxar se soltar do selo resultando em pontas afiadas, não tente retirar o selo à mão. Em vez disso, é aconselhada a utilização de uma pinça hemostática ou de outro dispositivo mecânico.
3. Depois de retirar o selo metálico, retire assepticamente a rolha. Pode ser mais fácil retirar o septo empurrando-o para fora do frasco em ambos os lados da ranhura do septo.
4. Inocular assepticamente a amostra no frasco através de um dispositivo sem agulha.
5. De forma asséptica, volte a colocar o septo no frasco, assegurando-se que o septo cabe totalmente na abertura. Coloque um novo vedante (BacT/ALERT® Reseal) sobre o septo e a abertura do frasco. O vedante deve ficar preso acima do aro do frasco, e o lado inferior do vedante tem que estar em contacto total com a parte superior do septo. O vedante deve estar bem preso ao frasco.
6. Assegurar uma mistura adequada dos reagentes e da amostra no frasco BacT/ALERT MP.

Procedimento de teste

1. Introduza os frascos de cultura inoculados BacT/ALERT MP no aparelho MB/BacT ou BacT/ALERT 3D seguindo as instruções fornecidas no Manual do Utilizador apropriado.
2. Depois de os frascos de cultura serem introduzidos no aparelho, devem permanecer aí durante 42 dias ou até serem designados como positivos.
3. Quando o aparelho indicar um frasco positivo, retirar o frasco de acordo com os procedimentos indicados no Manual do Utilizador do BacT/ALERT.
4. Deve ser efectuado um esfregaço e uma repicagem para bacilos ácido-álcool-resistentes de todos os frascos designados como positivos. A repicagem pode ser realizada removendo a amostra com uma agulha e seringa de frascos com ou sem vedante.
   a. **Repicagens de frascos positivos sem um vedante utilizando uma agulha e uma seringa.** Numa câmara de segurança biológica, misturar o conteúdo do frasco, desinfectar a tampa do frasco e retirar a amostra para a coloração ácido-álcool-resistente e para a repicagem. Desinfectar a tampa do frasco após a repicagem.
   b. **Repicagens de frascos positivos selados com o vedante.** Puxar a patilha central, afastando-a do vedante, e retirar completamente o selo do frasco. Depois de retirar assepticamente o septo, a amostra pode ser retirada. Se pretender guardar o frasco para realizar outros testes, voltar a colocar assepticamente a tampa e colocar um vedante novo sobre a tampa e o frasco.

   Se o resultado do esfregaço ácido-álcool-resistente for positivo, continuar com os procedimentos de identificação de micobactérias específicos empregues pela sua instituição. Se o esfregaço concentrado for negativo para bacilos ácido-álcool-resistentes, deve realizar-se uma coloração de Gram. Se tanto o esfregaço ácido-resistente como a coloração de Gram forem negativos, indicando um possível falso positivo, o frasco deve ser recarregado no aparelho até ao crescimento da repicagem ou à sua redesignação como positivo ou negativo. Deve ser efectuado um esfregaço e uma repicagem das culturas que foram inicialmente determinadas como falsas positivas e posteriormente designadas como positivas.
5. Se forem vistos microrganismos não micobacterianos na coloração de Gram, processar novamente todo o conteúdo do frasco com outro procedimento de descontaminação e inocular num novo frasco de cultura BacT/ALERT MP, ou eliminar e obter outra amostra para cultura. Se o novo frasco de cultura BacT/ALERT MP voltar a desenvolver microrganismos não micobacterianos, este deve ser eliminado e deve obter-se uma nova amostra para cultura.
6. As culturas de sinal negativo no tempo de teste máximo devem ser examinadas visualmente, verificando se apresentam turvação. Se o conteúdo do frasco estiver turvo, obter assepticamente uma amostra para coloração ácido-resistente e para repicagem, de acordo com o protocolo utilizado no seu laboratório. Os frascos que não apresentem turvação podem ser eliminados. Descontaminar todos os frascos antes de os eliminar.
7. Os procedimentos de carregamento e descarregamento de frascos de cultura no aparelho MB/BacT ou BacT/ALERT 3D são apresentados no Manual do Utilizador.
8. **Não reutilize frascos de cultura BacT/ALERT.** Elimine frascos de cultura BacT/ALERT inoculados de acordo com o protocolo utilizado no seu laboratório. É apropriado proceder à autoclavagem e/ou incineração dos frascos BacT/ALERT inoculados.[9]

RESULTADOS

Os frascos de cultura positivos ou negativos são determinados pelo software de tomada de decisão contido nos Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT 3D. Não é necessária qualquer medida até o aparelho assinalar os frascos de cultura positivos ou negativos.

Apresentação do relatório dos resultados

Resultados	Relatório
Sinal +/esfregaço BAAR +	Positivo para BAAR; identificação pendente
Sinal +/esfregaço BAAR –	Sem relatório; ou a amostra está contaminada com microrganismos não micobacterianos; impossível determinar a presença/ausência de BAAR

Apresentar em relatório os resultados preliminares apenas depois de ser realizada uma coloração ácido-álcool-resistente.

CONTROLO DE QUALIDADE

Cada caixa de frascos de cultura BacT/ALERT MP inclui um Certificado de Conformidade indicando um desempenho de crescimento satisfatório de *M. tuberculosis* ATCC 25177 and *M. intracellulare* ATCC 13950. Após a recepção, os novos lotes ou carregamentos de frascos de cultura de BacT/ALERT MP ou reagentes podem ser testados para controlo de qualidade. Consulte o procedimento M22-A3 do CLSI/NCCLS quanto aos microrganismos de controlo de qualidade apropriados. Seguir o procedimento de preparação e inoculação do frasco:

1. Adicionar 0,5 ml de suplemento de antibiótico rehidratado MB/BacT a cada frasco de cultura BacT/ALERT MP necessário para o teste.
2. Inocular os frascos representativos com 0,5 ml dos microrganismos de controlo, diluídos até 10^4 UFC/ml, em soro fisiológico estéril ou em meio líquido não suplementado Middlebrook 7H9 (lote aprovado) estéril.
3. Depois de obter os resultados antecipados, utilizar os restantes frascos para testar as amostras clínicas. Se não forem obtidos os resultados esperados, contactar a Assistência a Clientes da bioMérieux.

Aparelho

É fornecida uma embalagem de Reflectância Padrão BacT/ALERT com cada aparelho para os procedimentos de CQ e de Calibração. O controlo de qualidade deve fazer parte da manutenção normal do sistema. Para obter mais informações, consulte o Manual do Utilizador do sistema BacT/ALERT.

LIMITAÇÕES DO TESTE

Muitas variáveis envolvidas em testes micobacterianos não podem, sob o ponto de vista prático, ser controladas de forma a fornecer uma total confiança de que os resultados obtidos se devam apenas ao comportamento funcional correcto ou incorrecto de qualquer meio de cultura ou sistema de detecção.

1. As culturas obtidas para um diagnóstico primário após a iniciação da terapia antimicrobiana podem produzir resultados negativos.
2. A recuperação das micobactérias nos frascos BacT/ALERT MP depende da qualidade da amostra recolhida, do número de microrganismos passíveis de crescer em cultura existentes no volume da amostra e do método de processamento. O cumprimento das instruções dos procedimentos é crítico para que haja uma recuperação óptima das micobactérias.
3. Os microrganismos são, muitas vezes, em número reduzido. É geralmente recomendada a colheita de amostras durante três dias consecutivos.
4. O processamento/descontaminação inadequados ou atrasos no transporte das amostras pode resultar num sobre-crescimento de bactérias, as quais podem contaminar a cultura em meio líquido. Todo o meio de cultura poderá ficar contaminado nem que seja pela presença de apenas uma bactéria viável na amostra após o processamento.
5. Podem ser detectados contaminantes resistentes aos antibióticos contidos no suplemento de antibiótico MB/BacT.
6. A morfologia e a pigmentação da colónia devem apenas ser determinadas em meios sólidos.
7. Os frascos de cultura BacT/ALERT MP com um sinal positivo podem conter uma ou mais espécies de micobactérias e/ou outras espécies não micobacterianas. Nas culturas de micobactérias mistas em meio líquido, as micobactérias de crescimento mais lento podem ser ultrapassadas pelas de crescimento mais rápido ou a cultura pode ser eliminada mais cedo, após ser descoberta a micobactéria de crescimento mais rápido. A identificação das micobactérias presentes exige a realização de uma repicagem e de outros procedimentos adicionais para identificação dos microrganismos presentes. A consistência da morfologia microscópica nos frascos de cultura BacT/ALERT MP ainda não foi estabelecida.
8. A contaminação por micobactérias saprófitas na água da torneira ou noutros reagentes e equipamento de laboratório pode provocar resultados "clinicamente" falsos positivos (recuperação de micobactérias que não estão na amostra clínica).
9. É recomendada a descontaminação com o método de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio. Não foram testados outros métodos de descontaminação em conjunto com o meio de cultura BacT/ALERT MP. Os reagentes descontaminantes digestivos podem ter efeitos nocivos sobre as micobactérias.
10. As micobactérias podem variar na ácido-álcool-resistência dependendo da estirpe, tempo da cultura e de outras variáveis. Todos os frascos com um sinal positivo BacT/ALERT MP ou que se apresentem turvos devem ser repicados para meios micobacterianos selectivos e não selectivos. As espécies não micobacterianas podem ultrapassar as micobactérias presentes. Estes frascos de cultura devem ser descontaminados e colocados novamente em cultura.
11. Os frascos de cultura BacT/ALERT MP são incubados a 35° C, excluindo o isolamento das micobactérias que requerem outras temperaturas de incubação (por exemplo, *M. marinum, M. ulcerans* e *M. haemophilum*). A recuperação desses microrganismos requer métodos de cultura adicionais. Os microrganismos com requisitos de crescimento especiais (por exemplo, *M. haemophilum*) podem não ser isolados em frascos BacT/ALERT MP quando incubados à temperatura apropriada. Os isolados que se seguem foram recuperados em estudos analíticos: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* e *M. xenopi*. Desconhece-se a capacidade dos frascos BacT/ALERT MP recuperarem outros isolados pouco comuns.
12. As amostras de tecido moído são difíceis de inocular nos frascos de cultura BacT/ALERT MP com agulhas de segurança e seringas. Para assegurar uma inoculação adequada, as amostras de tecido devem ser submetidas a uma moagem suficientemente fina para permitir uma inoculação adequada do material nos frascos BacT/ALERT MP. Além disso, pode ser vantajoso utilizar agulhas de segurança mais largas ou retirar a tampa de protecção amovível, adicionar assepticamente a amostra moída e aplicar um vedante no frasco de cultura BacT/ALERT MP. Caso se suspeite de contaminação das amostras de tecido moído, deve proceder-se à sua descontaminação e processamento antes de as adicionar aos frascos BacT/ALERT MP. Isto irá permitir uma recuperação máxima das micobactérias que possam estar presentes.
13. A incubação prolongada ou a adição de Mycobactin J pode ser necessária quando se suspeita da presença de *M. malmoense* ou *M. genavense.* As *M. malmoense* e *M.genavense* são conhecidas por exigirem um prazo de incubação mais alargado do que o normalmente empregue em muitos laboratórios dos E.U.A.[2]
14. O suplemento de antibiótico, apesar de ser necessário para testar a maioria das amostras, pode inibir o crescimento de algumas micobactérias.
15. As taxas de falsos negativos da avaliação clínica da bioMérieux foram de 0,2 %.

CARACTERÍSTICAS DO COMPORTAMENTO FUNCIONAL DO TESTE

Foram realizados estudos comparativos de culturas inoculadas utilizando os seguintes microrganismos em níveis $\leq 10^6$ UFC/frasco e $\leq 10^2$ UFC/frasco.

Microrganismo	Inóculo (UFC/frasco)	Tempo até à detecção (dias)[1] BacT/ALERT MP (Plástico)
Complexo TB		
M. tuberculosis (4 estirpes)	$\leq 10^6$	5,6 – 10,3
	$\leq 10^2$	13,7 – 18,8
M. bovis (2 estirpes)	$\leq 10^6$	7,1 – 7,8
	$\leq 10^2$	14,4 – 17,4
Fotocromogéneos (Runyoun I)		
M. kansasii (2 estirpes)	$\leq 10^6$	7,4 – 8,8
	$\leq 10^2$	13,1 – 15,0
M. simiae	$\leq 10^6$	4,1
	$\leq 10^2$	8,9
Escotocromogéneos (Runyoun II)		
M. gordonae	$\leq 10^6$	14,1
	$\leq 10^2$	23,7
M. xenopi (2 estirpes)	$\leq 10^6$	10,3 – 13,8
	$\leq 10^2$	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 estirpes)	$\leq 10^6$	12,6 – 23,3
	$\leq 10^2$	20,7 – NG[3]
Não-cromogéneos (Runyoun III)		
M. avium (4 estirpes)	$\leq 10^6$	4,2 – 6,8
	$\leq 10^2$	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 estirpes)	$\leq 10^6$	5,6 – 7,1
	$\leq 10^2$	10,8 – 16,2
M. malmoense	$\leq 10^6$	15,4
	$\leq 10^2$	21,9
De crescimento rápido (Runyoun IV)		
M. chelonae	$\leq 10^6$	2,2
	$\leq 10^2$	4,1
M. fortuitum (2 estirpes)	$\leq 10^6$	3,5 – 4,1
	$\leq 10^2$	3,9 – 8,9

[1] Cada microrganismo foi testado com suplemento de antibiótico MB/BacT. Os testes foram realizados para frascos simples a $\leq 10^6$ e em triplicado a $\leq 10^2$. Os dados indicados representam um intervalo de valores de estirpes múltiplas, excepto para *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* e *M. chelonae*, onde são indicados os dados para o microrganismo individual.
[2] Um de três frascos não apresentou qualquer crescimento após 42 dias; o valor fornecido é a média de dois frascos.
[3] Um microrganismo testado não apresentou qualquer crescimento para três de três frascos após 42 dias.

BIBLIOGRAFIA

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

APRESENTAÇÃO

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/caixa	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 testes/kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 frascos/kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 frascos/kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 unidades/embalagem	REF 259787

Para obter assistência técnica nos EUA, contacte o Serviço de Atendimento ao Cliente da bioMérieux, através do telefone 1-800-682-2666. Fora dos EUA, contacte o representante local da bioMérieux.

A bioMérieux, o logótipo azul e BacT/ALERT são marcas comerciais utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais.

Amphyl é uma marca comercial registada da Linden Corporation.

ATCC é uma marca comercial registada da American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Julho de 2008

BacT/ALERT® MP

BRASILEIRO PORTUGUÊS

43-03064

INDICA SEÇÃO REVISADA

Armazene protegido da luz solar direta entre 2°C e 8°C.

Consulte o glossário de símbolos no final do documento.

USO INDICADO

O Sistema BacT/ALERT® MP é composto de frascos de cultura BacT/ALERT MP com tampa removível usados em conjunto com o MB/BacT® Antibiotic Supplement (e/ou o MB/BacT Reconstitution Fluid). O Sistema BacT/ALERT MP foi desenvolvido para ser usado com os Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT® 3D para a recuperação e a detecção de micobactérias em amostras não sanguíneas estéreis do corpo e de amostras clínicas digeridas e descontaminadas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A tuberculose ainda é considerada um grande problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde estima que, por ano, 9 milhões de novos casos e 2 milhões de mortes estão diretamente associados a essa doença.[1] A tuberculose foi citada como a causa principal de morte em muitos países sem recursos e em desenvolvimento.[2] Nos Estados Unidos, o número de novos casos relatados ao CDC (Centers for Disease Control - Centros de Controle de Doença) aumentou muito em 1992.[2,3] Desde então, tem havido um declínio substancial e constante no número de casos relatados anualmente nos EUA, principalmente devido à implementação de medidas de prevenção e controle de 1989 até 1993.[2] No entanto, ainda há um aumento significativo do número de casos em alguns grupos da população, particularmente entre pessoas nascidas fora dos Estados Unidos e seus territórios. As infecções causadas por organismos complexos de *M. Tuberculosis* são doenças classicamente pulmonares.

As micobactérias, com exceção do bacilo da tuberculose (MOTT), são tratadas aqui como micobactérias não tuberculosas (NTM - nontuberculosis mycobacteria). A maioria destes isolados requer incubação entre 35°C e 37°C, exceto quando especificado em contrário. Esses organismos são comumente encontrados no solo e na água, e têm sido considerados como patógenos oportunistas em pacientes com doença pulmonar latente, supressão imunológica ou trauma percutâneo.[4] As NTMs associadas a doenças pulmonares são: *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum complex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* e *M. xenopi* (temperatura ideal de 42°C). As *M. marinum* e *M. ulcerans*, que requerem incubação a 30°C, são NTMs associadas a infecções cutâneas. As NTMs produtoras de outros tipos de infecção (p.ex., doenças disseminadas, linfadenite, etc.) são: MAC, complexos de *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum* (os isolados de *M. chelonae* podem requerer incubação a 30°C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* e *M. haemophilum* (requer adição de hemina e incubação a 30°C).[2]

As micobactérias são bacilos aeróbios, não formadores de esporos, não móveis, dependentes de ácido, com taxas de crescimento baixas a muito baixas; os tempos de geração de espécies variam de 2 a >20 horas, dependendo da espécie.[2] O crescimento de *M. tuberculosis* usando meio micobacteriano tradicional pode levar de duas a oito semanas ou mais.[5] O CDC recomenda o uso de meio de cultura líquido, junto com o meio sólido, para cultura primária.[6,7] O método com cultura líquida é necessário para fornecer detecção, crescimento e resultados de suscetibilidade mais rápidos para *M. tuberculosis*.[7]

Os sistemas MB/BacT e BacT/ALERT 3D, usados em conjunto com o sistema BacT/ALERT MP, fornecem um sistema de detecção microbiana e um meio de cultura com condições ambientais e nutricionais adequadas para recuperar espécies micobacterianas comumente isoladas em amostras não sanguíneas de pacientes. O MB/BacT Antibiotic Supplement foi desenvolvido para reduzir a incidência de contaminação "break-through" devido a bactérias que podem sobreviver ao processo de descontaminação/concentração. O MB/BacT Antibiotic Supplement deve ser adicionado aos frascos de BacT/ALERT MP antes da inoculação de todas as amostras não estéreis. Para a recuperação de micobactérias presentes em amostras estéreis, deve-se adicionar somente o fluido de reconstituição aos frascos de BacT/ALERT MP. O MB/BacT Reconstitution Fluid contém os componentes necessários para assegurar o crescimento ideal das micobactérias presentes na amostra do paciente. Os frascos inoculados são colocados no aparelho, onde são incubados e continuamente monitorados quanto à presença de micobactérias no frasco de cultura BacT/ALERT MP.

PRINCÍPIO DO TESTE

Os sistemas MB/BacT e BacT/ALERT 3D utilizam, para detectar microrganismos em culturas micobacterianas, o mesmo princípio descrito para o Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® em relação a hemoculturas.[8] Os Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT e BacT/ALERT 3D utilizam um sensor colorimétrico e luz refletida para monitorar a presença e a produção de dióxido de carbono (CO_2) dissolvido no meio de cultura. Se houver microrganismos presentes na amostra testada, o dióxido de carbono é produzido à medida que os organismos metabolizam os substratos no meio de cultura. Quando há produção de CO_2 devido ao crescimento de microorganismos, a cor do sensor permeável a gás instalado no fundo de cada frasco de cultura muda para verde-claro ou amarelo. As cores mais claras resultam em um aumento das unidades de refletância monitoradas pelo sistema. A cada 10 minutos, o aparelho monitora e registra a refletância do frasco. No momento da detecção, o número aproximado de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml é de 10^6-10^7.

REAGENTES

Para uso em diagnóstico *in vitro*.

ADVERTÊNCIA: Para reduzir os riscos de exposição acidental a agentes infecciosos, devem-se tomar precauções adicionais ao usar o frasco de cultura BacT/ALERT MP no Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT. É altamente recomendável que o aparelho seja colocado em um laboratório utilizado para a cultura rotineira de *M. tuberculosis*. Para atividades que envolvam a propagação e a manipulação de *M. tuberculosis* ou o crescimento de *Mycobacterium sp.* na cultura, recomendamos práticas, equipamentos de contenção e instalações com nível de biossegurança 3.[9]

BacT/ALERT® MP (código de cor vermelho) – os frascos de cultura descartáveis BacT/ALERT MP contêm 10 ml de meio e um sensor interno que detecta o dióxido de carbono como indicador de crescimento microbiano. Os frascos de cultura BacT/ALERT MP podem ser inoculados utilizando-se uma seringa estável, tanto com agulha com trava quanto com agulha com bainha, ou retirando a tampa e utilizando um aparelho de inoculação sem agulha.

A fórmula do meio consiste em: caldo Middlebrook 7H9 (0,47% p/v), digerido pancreático de caseína (0,1% p/v), albumina sérica bovina (1,0% p/v), catalase (48 u/ml), em água destilada. Os frascos contêm 10 ml de meio e são preparados com uma atmosfera de CO_2, nitrogênio e oxigênio, a vácuo. A composição do meio pode ser ajustada para atender aos critérios específicos de desempenho.

CUIDADO: Os frascos de cultura BacT/ALERT contêm policarbonato. Nem todos os desinfetantes são próprios para uso em superfícies de policarbonato e podem causar deterioração do frasco. Verifique a compatibilidade do desinfetante com o policarbonato antes de usá-lo nas superfícies de frascos de cultura BacT/ALERT.

CUIDADO: É possível que certas micobactérias raras e exigentes não cresçam ou cresçam lentamente no meio de cultura dos frascos BacT/ALERT MP. Se houver suspeita de micobactérias raras e exigentes, que requeiram meio de cultura e condições especiais, deve-se recorrer a métodos alternativos ou aumentar o tempo de incubação para a recuperação.

CUIDADO: Em algumas ocasiões raras, é possível encontrar organismos que crescem nos meios de cultura dos frascos BacT/ALERT MP mas não produzem uma quantidade suficiente de dióxido de carbono para serem determinados como positivos. Por exemplo, as amostras de pacientes que estejam sendo submetidos a tratamento com agentes antimicobacterianos podem apresentar um crescimento deficiente.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement - suplemento liofilizado contendo anfotericina B (0,0180% p/v), azlocilina (0,0034% p/v), ácido nalidíxico (0,0400% p/v), polimixina B (10.000 unidades), trimetoprim (0,00105% p/v), vancomicina (0,0005% p/v) e um agente espessante antes do processamento. A composição do suplemento pode ser ajustada para atender aos critérios específicos de desempenho. Reconstitua com 10 ml de MB/BacT Reconstitution Fluid.

MB/BacT® Reconstitution Fluid - ácido oléico (0,05% p/v), glicerol (5% p/v), amaranto (0,004% p/v) e albumina sérica bovina (1% p/v) em água destilada. Cada frasco contém um volume total de preenchimento de 15 ml. A composição do fluido de reconstituição pode ser ajustada para atender aos critérios específicos de desempenho.

Materiais adicionais necessários

Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT 3D
Água destilada esterilizada ou deionizada
Caldo Middlebrook 7H11 ou outro ágar para micobactérias ou meio de cultura com ovo
Autoclave
N-acetil-L-cisteína em pó
Tampão fosfato estéril 0,067 M, pH 6,8
Centrífuga
Incubadora de CO_2, 37°C
Seringas estéreis com agulhas com trava ou agulhas com bainha
Pipetas estéreis ou outro dispositivo estéril de inoculação sem uso de agulha para frascos de cultura com tampas removidas
BacT/ALERT® Reseal para sistema de fechamento removível
Desinfetante micobactericida
Algodão com álcool
Misturador tipo vortex
Tubos de polipropileno de 50 ml, cônicos, estéreis, para centrífuga
Cabine de segurança biológica
Luvas descartáveis estéreis
Jalecos descartáveis
Máscaras descartáveis
Microscópio
Materiais corantes para lâminas
Organismos de Controle de Qualidade

Materiais disponíveis da bioMérieux

Sistema de Detecção de Micobactéria MB/BacT ou Sistemas de Detecção Microbiana BacT/ALERT

Precauções

1. AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECTANTE. Observe as precauções universais ao manusear e descartar materiais infectantes.
2. A manipulação de organismos complexos de *M. tuberculosis* desenvolvidos em cultura exige práticas, equipamentos de contenção e instalações com nível de biossegurança 3.[9]
3. Todos os frascos de cultura BacT/ALERT MP, dispositivos de coleta de amostras, seringas, pipetas ou outros dispositivos de inoculação sem o uso de agulha usados para inoculação devem ser descontaminados de acordo com os procedimentos da sua instituição.[2]
4. Em caso de derramamento ou quebra, pode-se formar um aerossol de micobactérias (incluindo *M. tuberculosis*) ou de outras bactérias. Siga as diretrizes de segurança específicas da sua instituição e do CDC/NIH.[9] Desinfetantes fenólicos, como o Amphyl®, são agentes apropriados para a descontaminação de micobactérias e outros microrganismos.
5. Os frascos de cultura devem ser utilizados apenas por técnicos de laboratório treinados.

Instruções de armazenamento

Armazene os frascos de cultura BacT/ALERT MP e o Kit MB/BacT Antibiotic Supplement sob refrigeração (2 a 8°C). Proteja da luz solar direta. Antes de usar, deixe os frascos de cultura BacT/ALERT MP se estabilizarem à temperatura ambiente (30 a 60 minutos). O prazo de validade está impresso na etiqueta de cada frasco. Os frascos de cultura não devem ser usados após o último dia do mês indicado.

APARELHOS

Antes de usar, consulte o Manual do Usuário do Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT com o Suplemento do Manual do Usuário do MB/BacT.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Os procedimentos corretos de coleta, transporte, manuseio e preparo das amostras são extremamente importantes na análise precisa das culturas de pacientes para a detecção de espécies micobacterianas que possam estar presentes. Colha e processe as amostras de acordo com o Clinical Microbiology Procedures Handbook (Manual de Procedimentos em Microbiologia Clínica)[10] ou conforme definido no manual de procedimentos do seu laboratório. Recomenda-se descontaminação com N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sódio para o processamento de amostras não estéreis.

NOTA: A bioMérieux recomenda que o pH final da amostra de inóculo fique entre 6,8 e 7,2.

PROCEDIMENTOS

1. Antes de serem usados, os frascos de cultura BacT/ALERT MP devem ser examinados para assegurar que não há sinais de dano ou deterioração (descoloração). Frascos que apresentem evidências de danos, vazamento ou deterioração devem ser descartados. O meio deve estar transparente, mas pode haver formação de precipitados a temperaturas abaixo de 20°C. Não confunda precipitação com turbidez. Não use frascos com meio turvo, excesso de pressão gasosa ou sensor amarelo; essas características são indícios de possível contaminação.
2. Antes de usar, inspecione visualmente todos os frascos de MB/BacT Reconstitution Fluid para verificar se há sinais de dano ou contaminação. Não use o frasco se houver indícios de rachaduras ou vazamento.
3. Antes do uso, examine visualmente as ampolas de MB/BacT Antibiotic Supplement para verificar se há rachaduras ou degradação do liofilizado. A ampola não deve ser utilizada se forem observadas rachaduras ou degradação.
4. Use seringas com agulha com mecanismo de trava de segurança ou seringas com agulha com bainha quando a tampa não for retirada para a inoculação.
5. Sempre transporte os frascos inoculados em um rack ou cesta.

Preparação do MB/BacT Antibiotic Supplement

Antes de usar, adicione assepticamente 10 ml de MB/BacT Reconstitution Fluid a cada frasco de MB/BacT Antibiotic Supplement a ser usado no teste. Deixe o liofilizado dissolver. Misture os ingredientes agitando delicadamente.

NOTAS:
- Uma ampola de MB/BacT Antibiotic Supplement reconstituído é suficiente para 20 frascos de cultura BacT/ALERT MP.
- Uma vez reconstituído, o MB/BacT Antibiotic Supplement é válido por 7 dias quando armazenado a 2-8°C. A data de validade do suplemento reconstituído deve ser registrada no rótulo da ampola.
- O fluido de reconstituição restante pode ser armazenado entre 2 e 8°C para ser usado posteriormente com amostras estéreis.

Inoculação e preparação dos frascos

NOTA: Tome cuidado para evitar contaminação durante o preparo do frasco e durante a inoculação da amostra do paciente.

1. Rotule cada frasco de cultura BacT/ALERT MP com as informações do paciente. Os ícones no rótulo do frasco (☺,#,☽) podem ser definidos pelo usuário. Os frascos devem ser estabilizados à temperatura ambiente (30 a 60 minutos) antes da inoculação.
2. Desinfete a divisória com um algodão com álcool ou equivalente. Deixe a divisória do frasco secar antes de adicionar o suplemento antibiótico reconstituído ou o fluido de reconstituição.
3. Antes da inoculação, adicione assepticamente 0,5 ml de MB/BacT Antibiotic Supplement reconstituído a cada frasco de cultura BacT/ALERT MP a ser usado na cultura de amostras não estéreis, ou apenas 0,5 ml de MB/BacT Reconstitution Fluid para cada frasco de cultura BacT/ALERT a ser usado na cultura de amostras estéreis. O MB/BacT Reconstitution Fluid contém os componentes necessários para assegurar o crescimento ideal das micobactérias presentes nas amostras dos pacientes.
   a. Transfira assepticamente o suplemento antibiótico reconstituído ou o fluido de reconstituição para cada frasco de cultura BacT/ALERT MP.
   b. O corante rosa existente no meio indicará que o suplemento ou o fluido de reconstituição foi adicionado com êxito.

NOTA: As etapas a seguir devem ser realizadas em uma cabine de segurança biológica com roupas de proteção apropriadas em conformidade com os padrões de segurança estabelecidos pelo CDC/NIH para as diretrizes de segurança biológica de nível 3.[9]

Inoculação com agulhas de segurança

1. Obtenha cada amostra de paciente processada ou estéril usando uma seringa com uma agulha com trava de segurança anexada ou com uma agulha com bainha, e transfira assepticamente 0,5 ml para o frasco de cultura BacT/ALERT MP devidamente rotulado. Não é preciso ventilar o frasco. Recomenda-se realizar a inoculação do meio sólido simultaneamente. O restante da amostra processada pode ser armazenado sob refrigeração (2-8°C) para uso posterior.
2. Limpe as tampas dos frascos com uma gaze embebida em solução de Amphyl a 2% (ou outro desinfetante aprovado como tuberculocida). Deixe secar antes de retirar da cabine de segurança biológica.
3. Garanta uma mistura adequada de reagentes e amostra no frasco BacT/ALERT MP.

Inoculação usando dispositivos sem agulha

NOTA: Tome cuidado para evitar contaminação durante o preparo do frasco e durante a inoculação da amostra do paciente.

1. Se o método escolhido for o de inoculação asséptica sem agulha, siga as instruções abaixo após a adição asséptica do suplemento antibiótico e do fluido de reconstituição ao frasco, conforme descrito no folheto da embalagem.
2. Retire o lacre metálico puxando a lingüeta central da tampa até atingir o aro do lacre. Evite quebrar a lingüeta. Continue a puxá-la ao redor do frasco para retirar completamente o lacre.

   CUIDADO: Retire a tampa metálica prensada com cuidado. Se a lingüeta quebrar, separando-se da tampa e formando bordas afiadas, não tente retirar a tampa com a mão. Use uma pinça hemostática ou outro dispositivo mecânico para isso.
3. Após a remoção do lacre metálico, retire assepticamente a divisória. Pode ser mais fácil retirar a divisória se ela for levantada do frasco em um dos lados da fenda.
4. Inocule assepticamente a amostra no frasco com um dispositivo sem agulha.
5. Coloque a divisória de volta no frasco, assepticamente, certificando-se de que ela se encaixa perfeitamente na abertura. Coloque um novo lacre (BacT/ALERT® Reseal) sobre a divisória e a abertura do frasco. O Reseal deve se encaixar na borda do frasco e a parte de baixo deve ficar em contato total com a parte de cima da divisória. O lacre deve se ajustar firmemente ao frasco.
6. Garanta uma mistura adequada de reagentes e amostra no frasco BacT/ALERT MP.

Procedimento de teste

1. Coloque os frascos de cultura inoculados BacT/ALERT MP no aparelho MB/BacT ou BacT/ALERT 3D e siga as instruções fornecidas no Manual do Usuário correspondente.
2. Uma vez colocados no aparelho, os frascos devem permanecer ali por 42 dias ou até serem designados como positivos.
3. Quando o aparelho indicar um frasco positivo, retire-o de acordo com os procedimentos contidos no Manual do Usuário do BacT/ALERT.
4. Devem-se fazer esfregaço e subcultura de todos os frascos determinados como positivos para a detecção de bacilos ácido-resistentes. A subcultura pode ser realizada removendo a amostra com agulha e seringa dos frascos sem lacre ou com lacre.
   a. **Subcultura de frascos positivos sem lacre usando agulha e seringa.** Em uma cabine de segurança biológica, misture os conteúdos dos frascos, desinfete a tampa do frasco e retire a amostra para subcultura e coloração de bactérias ácido-resistentes. Desinfete a tampa do frasco após a subcultura.
   b. **Subcultura de frascos positivos com lacre.** Puxe a lingüeta central do lacre e retire-o totalmente. Depois de retirar a divisória assepticamente, a amostra pode ser retirada. Se quiser guardar o frasco para testes adicionais, recoloque a tampa assepticamente e coloque um novo lacre sobre a tampa e o frasco.

   Se o esfregaço para bactérias ácido-resistentes for positivo, realize os procedimentos de identificação de micobactéria específicos empregados por sua instituição. Se o esfregaço concentrado for negativo para bacilos ácido-resistentes, deve-se realizar uma coloração de Gram. Se o esfregaço ácido-resistente e a coloração de Gram forem negativos, indicando um possível falso positivo, o frasco deve ser colocado de volta no aparelho até que ocorra o crescimento da subcultura ou até serem redesignados como positivo ou negativo. Devem-se fazer esfregaço e subcultura de culturas que inicialmente resultaram em falso positivo e foram redesignadas como positivas.
5. Se organismos não micobacterianos forem detectados na coloração de Gram, reprocesse todo o conteúdo do frasco por meio de outro procedimento de descontaminação e inocule em um novo frasco de cultura BacT/ALERT MP, ou descarte e obtenha outra amostra para cultura. Se houver crescimento de organismos não micobacterianos no novo frasco de cultura BacT/ALERT MP, descarte-o e obtenha uma nova amostra para cultura.
6. As culturas com sinal negativo no intervalo de tempo de teste máximo devem ser examinadas visualmente para a detecção de turbidez. Se os conteúdos dos frascos estiverem turvos, obtenha assepticamente uma amostra para coloração ácido-resistente e faça a subcultura de acordo com o protocolo do seu laboratório. Os frascos que não apresentarem turbidez podem ser descartados. Descontamine todos os frascos antes de descartar.
7. Os procedimentos de colocação e retirada dos frascos de cultura do aparelho MB/BacT ou do BacT/ALERT 3D encontram-se no Manual do Usuário.
8. **Não reutilize os frascos de cultura BacT/ALERT.** Descarte os frascos de cultura BacT/ALERT inoculados de acordo com o protocolo do seu laboratório. É conveniente usar autoclave e/ou incinerar os frascos BacT/ALERT inoculados.[9]

RESULTADOS

Os frascos de cultura positivos ou negativos são determinados pelo software de tomada de decisão contido nos Sistemas de Detecção de Micobactérias MB/BacT ou BacT/ALERT 3D. Nenhuma ação é necessária até o aparelho sinalizar os frascos de cultura como negativos ou positivos.

Relatório dos resultados

Resultados	Relatório
Sinal +, Esfregaço AFB +	AFB positivo; identificação pendente
Sinal +, Esfregaço AFB –	Sem relato; ou amostra contaminada com organismos não micobacterianos; impossível determinar presença/ausência de AFB

Informe os resultados preliminares somente após a realização de coloração ácido-resistente.

CONTROLE DE QUALIDADE

Um Certificado de Conformidade acompanha cada caixa de frascos de cultura BacT/ALERT MP, indicando desempenho de crescimento de *M. tuberculosis* ATCC 25177 e *M. intracellulare* ATCC 13950 satisfatório. Após o recebimento, novos lotes ou remessas de frascos de cultura BacT/ALERT MB ou reagentes podem ser testados para controle de qualidade. Consulte o CLSI/NCCLS M22-A3 para obter informações sobre os organismos de Controle de Qualidade apropriados. Siga o procedimento de preparo e inoculação do frasco:

1. Adicione 0,5 ml de MB/BacT Antibiotic Supplement reidratado a cada frasco de cultura BacT/ALERT MP necessário para o teste.
2. Inocule frascos representativos com 0,5 ml de organismos de controle, diluídos a 10^4 UFC/ml em caldo Middlebrook 7H9 estéril ou em solução salina fisiológica e não enriquecida (lote aprovado).
3. Após a obtenção dos resultados esperados, use os frascos restantes para testar amostras clínicas. Se não obtiver os resultados esperados, entre em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente da bioMérieux.

Aparelho

Um kit de padrão de refletância BacT/ALERT acompanha cada instrumento para os procedimentos de controle de qualidade e calibração. O controle de qualidade deve fazer parte da manutenção normal do sistema. Consulte o Manual do Usuário do BacT/ALERT para obter mais informações.

LIMITAÇÕES DO TESTE

Na prática, muitas das variáveis envolvidas no teste micobacteriano não podem ser controladas para garantir que os resultados obtidos sejam devidos exclusivamente ao desempenho adequado ou inadequado de qualquer meio de cultura ou sistema de detecção.

1. Culturas obtidas para diagnóstico primário após o início de terapia antimicrobiana podem produzir resultados negativos.
2. A recuperação de micobactérias em frascos de BacT/ALERT MP depende da qualidade da amostra coletada, do número de organismos "culturáveis" por volume de amostra e do método de processamento. Seguir as instruções do procedimento é fundamental para uma recuperação ideal de micobactérias.
3. O número de organismos normalmente é pequeno. Geralmente, recomenda-se a coleta de amostras por três dias consecutivos.
4. Um processamento/descontaminação inapropriado ou atrasos no transporte das amostras podem resultar em crescimento excessivo de bactérias, o que, por sua vez, pode resultar em cultura de um caldo contaminado. Todo o meio de cultura pode ser contaminado se, após o processamento, houver uma bactéria viável presente na amostra.
5. Podem-se encontrar contaminantes resistentes a antibióticos no MB/BacT Antibiotic Supplement.
6. A morfologia e a pigmentação das colônias devem ser determinadas apenas em meio sólido.
7. Os frascos de cultura BacT/ALERT MP com sinal positivo podem conter uma ou mais espécies de micobactéria e/ou outras espécies não micobacterianas. Em culturas de micobactérias mistas em caldo, uma cultura de crescimento rápido pode excluir por competição a cultura de crescimento lento, ou a cultura pode ser descartada prematuramente, logo após a detecção de organismos de crescimento rápido. A identificação da micobactéria presente requer a execução de subcultura e procedimentos adicionais para identificar os organismos presentes. Não se estabeleceu a uniformidade da morfologia microscópica em frascos de cultura BacT/ALERT MP.
8. A contaminação com micobactéria saprofítica por meio de água da torneira ou outros reagentes de laboratório e equipamentos pode provocar resultados "clinicamente" falso positivos (recuperação de micobactérias não encontradas em amostras clínicas).
9. Recomenda-se o método de descontaminação por N-acetil-L-cisteína-Hidróxido de sódio. Outros métodos de descontaminação ainda não foram testados em conjunto com o meio de cultura BacT/ALERT MP. Reagentes descontaminantes e digestivos podem ter efeitos prejudiciais sobre as micobactérias.
10. Dependendo da estirpe, da idade da cultura e de outras variáveis, o grau de resistência a ácido das micobactérias pode variar. Todos os frascos de BacT/ALERT MP com sinal positivo ou com aparência turva devem ser subculturados, tanto em meio seletivo como em meio não seletivo para micobactérias. As espécies não micobacterianas podem crescer mais do que as micobactérias presentes. Esses frascos de cultura devem ser descontaminados e usados novamente para cultura.
11. Os frascos de cultura BacT/ALERT MP são incubados a 35ºC, o que impede a recuperação de micobactérias que requeiram outras temperaturas de incubação (p.ex., *M. marinum, M. Ulcerans* e *M. haemophilum).* A recuperação de tais organismos requer métodos de cultura adicionais. Organismos com necessidades de crescimento especiais (p.ex., *M. haemophilum*) talvez não se recuperem em frascos de BacT/ALERT MP quando incubados em temperatura apropriada. Os seguintes isolados foram recuperados em estudos analíticos: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* e *M. xenopi*. A capacidade de recuperação dos frascos BacT/ALERT MP para outros isolados incomuns é desconhecida.
12. As amostras de tecidos triturados são difíceis de inocular em frascos de cultura BacT/ALERT MP com agulhas e seringas de segurança. Para assegurar uma inoculação apropriada, as amostras de tecidos devem ser trituradas o suficiente para permitir a inoculação adequada do material nos frascos BacT/ALERT MP. Além disso, pode ser vantajoso usar agulhas de segurança com calibre maior ou retirar a tampa removível, adicionar assepticamente a amostra moída e aplicar o lacre (Reseal) ao frasco de cultura BacT/ALERT MP. Se houver suspeita de contaminação das amostras de tecido triturado, descontamine-as e processe-as antes da adição aos frascos BacT/ALERT MP. Isso permitirá recuperação máxima das micobactérias que possam estar presentes.
13. Pode ser preciso incubação prolongada ou adição de Mycobactin J quando houver suspeita da presença de *M. malmoense* ou *M. genavense*. Essas bactérias são conhecidas por precisarem de incubação prolongada além dos esquemas normais empregados em muitos laboratórios dos EUA.[2]
14. O suplemento antibiótico, embora necessário para testar a maioria das espécies, pode inibir o crescimento de algumas micobactérias.
15. As taxas de falso negativo na avaliação clínica da bioMérieux foram de 0,2%.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DO TESTE

Foram realizados estudos de inoculação usando os seguintes organismos em níveis ≤ 10^6 UFC/frasco e ≤ 10^2 UFC/frasco.

Microrganismo	Inóculo (UFC/frasco)	Intervalo de tempo até a detecção (dias)[1] BacT/ALERT MP (Plástico)
Complexo TB		
M. tuberculosis (4 estirpes)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 estirpes)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotocromógenos (Runyoun I)		
M. kansasii (2 estirpes)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Escotocromógenos (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 estirpes)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 estirpes)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Não-cromógenos (Runyoun III)		
M. avium (4 estirpes)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 estirpes)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Crescimento rápido (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 estirpes)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Cada organismo foi testado com MB/BacT Antibiotic Supplement. O teste foi realizado com frascos simples a ≤ 10^6 e em triplicata a ≤ 10^2. Os dados listados representam a variação dos valores de estirpes múltiplas, exceto para *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* e *M. Chelonae*, onde os dados para cada organismo individual são fornecidos.
[2] Um em cada três frascos não apresentou crescimento após 42 dias; o valor atribuído corresponde à média de dois frascos.
[3] Após 42 dias, um organismo testado não apresentou crescimento em três dos três frascos testados.

BIBLIOGRAFIA

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

DISPONIBILIDADE

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/caixa	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 testes/kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 ampolas/kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 ampolas/kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 unidades/caixa	REF 259787

Para obter assistência técnica nos EUA, entre em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente da bioMérieux, no número 1-800-682-2666. Em outros países, entre em contato com um representante regional da bioMérieux.

bioMérieux, o logotipo azul e BacT/ALERT são marcas comerciais usadas, pendentes e/ou registradas da bioMérieux SA ou de uma de suas subsidiárias.

Amphyl é uma marca registrada da Linden Corporation.

ATCC é uma marca registrada da American Type Culture Collection.

Atendimento ao Consumidor Tel. 0800-26 48 48

Fabricado por: bioMérieux, Inc., Durham, North Carolina, EUA
Distribuido por bioMérieux Brasil S/A
Estrada do Mapuá, 491 – Jacarepaguá
CEP 22710-261 Rio de Janeiro – RJ
CNPJ: 33.040.635/0001-71

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

CE

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2003, 2007, 2008

Julho de 2008

BacT/ALERT® MP

SVENSK

43-03064

BETECKNAR ETT REVIDERAT AVSNITT

Förvaras vid 2–8 °C, skyddat från direkt solljus.

Se symbollistan sist i bipacksedeln.

AVSEDD ANVÄNDNING

BacT/ALERT® MP-system består av BacT/ALERT MP-odlingsflaska med avtagbar förslutning, som används tillsammans med MB/BacT® antibiotikasupplement (och/eller MB/BacT rekonstitueringsvätska). BacT/ALERT MP system är avsett för användning med MB/BacT eller BacT/ALERT® 3D system för detektering av mykobakterier, för påvisande och detektering av mykobakterier i andra sterila vävnadsprover än blod, och i digererade-dekontaminerade kliniska prover.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Tuberkulos fortsätter att utgöra ett stort globalt hälsoproblem. Världshälsoorganisationen (WHO) uppskattar att 9 miljoner nya fall och 2 miljoner dödsfall årligen direkt kan tillskrivas denna sjukdom.[1] Tuberkulos har angetts som den främsta dödsorsaken bland många fattiga utvecklingsländer.[2] I USA förelåg 1992 en topp i antalet nya fall rapporterade till CDC.[2,3] Sedan dess har det skett en stadig och omfattande nedgång i antalet årliga fall rapporterade i USA, till största delen tack vare införande av preventions- och kontrollåtgärder under åren 1989 till 1993.[2] Det förekommer dock fortfarande en signifikant ökning av fall inom vissa befolkningsgrupper, särskilt bland personer födda utanför USA och dess territorier. Infektioner som orsakas av *M. tuberculosis*-komplexorganismer är vanligen lokaliserade i lungorna.

Andra mykobakterier än tuberkelbakterien (MOTT) refereras till som icke-tuberkulos-mykobakterier (NTM, nontuberculosis mycobacteria) i denna text. Majoriteten av dessa isolat kräver inkubering vid 35 till 37 °C förutom när annat anges. Dessa mikroorganismer återfinns oftast i jord och vatten och har implicerats såsom opportunistiska patogener hos patienter med bakomliggande lungsjukdom, immunsuppression eller perkutant trauma.[4] NTM som associeras med lungsjukdom är: *M. avium-komplex* (MAC), *M. kansasii, M. simiae, M. asiaticum, M. fortuitum-komplex, M. szulgai, M. malmoense, M. shimoidei, M. celatum* och *M. xenopi* (optimal temperatur 42 °C). *M. marinum* och *M. ulcerans*, som måste inkuberas vid 30 °C, är NTM som associeras med hudinfektioner. NTM som orsakar andra typer av infektioner (t.ex. disseminerad sjukdom, lymfadenit osv.) är: MAC, *M. kansasii, M. scrofulaceum, M. fortuitum-komplex* (*M. chelonae*-isolat kan behöva inkuberas vid 30 °C), *M. szulgai, M. simiae, M. genavense, M. celatum* och *M. haemophilum* (kräver tillsats av hemin och inkubering vid 30 °C).[2]

Mykobakterier är aeroba, icke-sporbildande, orörliga, syrafasta stavar, som växer långsamt eller mycket långsamt och generationstiderna hos olika arter varierar från 2 till >20 timmar beroende på art.[2] Växt av *M. tuberculosis* kan vid användning av traditionella medier för odling av mykobakterier ta två till åtta veckor eller ännu längre tid.[5] CDC rekommenderar att flytande odlingsmedium används tillsammans med fasta medier för primärodling.[6,7] Metoden med odling i flytande medium är nödvändig för att ombesörja snabbare detektering, växt och resistensbestämningsresultat för *M. tuberculosis*.[7]

MB/BacT och BacT/ALERT 3D-system för detektering av mykobakterier utgör vid användning tillsammans med BacT/ALERT MP-system både ett system för detektering av mikrober och ett odlingsmedium med lämpliga närings- och miljöförhållanden för tillväxt av sådana mykobakteriearter som vanligen isoleras från andra patientprover än blod. MB/BacT antibiotikasupplement är avsett att reducera förekomsten av kontaminering och överväxt av bakterier som överlevt dekontaminerings-/koncentreringsprocessen. MB/BacT antibiotikasupplement måste tillsättas till BacT/ALERT MP-flaskorna före inokulering med alla osterila prover. För påvisning av mykobakterier i sterila prover bör endast rekonstituerings-vätska tillsättas till BacT/ALERT MP-flaskorna. MB/BacT-rekonstitueringsvätska innehåller komponenter som är nödvändiga för att säkerställa optimal växt av mykobakterier som kan finnas närvarande i patientprovet. Inokulerade flaskor sätts in i instrumentet där de inkuberas och kontinuerligt övervakas för närvaro av mykobakterier som växer i BacT/ALERT MP-odlingsflaskan.

ANALYSPRINCIP

I MB/BacT och BacT/ALERT 3D system för detektering av mykobakterier utnyttjas samma princip för detektering av mikroorganismer i mykobakterieodlingar som den som beskrivs för BacT/Alert® system för detektering av mikrober vad gäller blododlingar.[8] I MB/BacT och BacT/ALERT 3D system för detektering av mykobakterier används en kolorimetrisk sensor och reflekterat ljus för att registrera närvaro och produktion av koldioxid (CO_2) löst i odlingsmediet. Vid förekomst av mikroorganismer i provet produceras koldioxid efterhand som mikroorganismerna metaboliserar substraten i odlingsmediet. När tillväxande mikroorganismer producerar CO_2, ändras färgen på den gaspermeabla sensorn som finns i botten av varje odlingsflaska till ljusgrönt eller gult. Den ljusare färgen resulterar i en ökning av de reflektansenheter som registreras av systemet. Flaskans reflektans kontrolleras och registreras av instrumentet var tionde minut. Vid tidpunkten för detektion är koncentrationen cirka 10^6-10^7 kolonibildande enheter (CFU) per ml.

REAGENSER

För *in vitro*-diagnostik.

VARNING: För att minska riskerna för oavsiktlig exponering för smittämnen ska ytterligare försiktighetsåtgärder vidtas när BacT/ALERT MB-odlingsflaska används i BacT/ALERT system för detektering av mikrober. Det rekommenderas starkt att instrumentet placeras på ett laboratorium som används för rutinodling av *M. tuberculosis*. För aktiviteter som innefattar förökning och hantering av *M. tuberculosis* eller *Mycobacterium sp.* som odlas på medium rekommenderas förfarande enligt biosäkerhetsnivå 3, spridningsskyddande utrustning och anläggningar.[9]

BacT/ALERT® MP (röd färgkod) – BacT/ALERT MP-odlingsflaskor för engångsbruk, med avtagbar förslutning, innehåller 10 ml odlingsmedium och en intern sensor som detekterar koldioxid som indikator på mikrobiell växt. BacT/ALERT MP-odlingsflaska kan inokuleras med hjälp av en steril spruta med en kanyl försedd med kanylskydd eller skyddshylsa, eller genom att förslutningen tas av och en kanylfri inokuleringsanordning används.

Odlingsmediets sammansättning utgörs av: Middlebrook 7H9-buljong (0,47 % vikt/volym), kasein nedbrutet med pankreasenzymer (0,1 % vikt/volym), bovint serumalbumin (1,0 % vikt/volym), katalas (48 u/ml), i renat vatten. Flaskorna innehåller 10 ml odlingsmedium och är framställda med en gasblandning av CO_2, kvävgas och syrgas i vakuum. Mediets sammansättning kan justeras för att uppfylla specifika funktionskrav.

FÖRSIKTIGHET: BacT/ALERT-odlingsflaskor innehåller polykarbonat. Alla typer av desinfektionsmedel är inte avsedda för användning på ytor som innehåller polykarbonat och kan orsaka en försämring av flaskan. Kontrollera desinfektionsmedlets kompatibilitet med polykarbonat innan du använder det till BacT/ALERT-odlingsflaskor.

FÖRSIKTIGHET: Det är möjligt att vissa sällsynta och krävande mykobakterier inte växer eller växer långsamt i odlingsmediet i BacT/ALERT MP-odlingsflaskorna. Vid misstanke om förekomst av sällsynta, krävande mykobakterier som fordrar speciella medier och odlingsförhållanden bör alternativa metoder eller förlängd inkubationstid för påvisning övervägas.

FÖRSIKTIGHET: I enstaka fall kan organismer påträffas, vilka växer i odlingsmediet i BacT/ALERT MP-odlingsflaskorna, men som inte producerar tillräckligt med koldioxid för att kunna klassas som positiva. Prover från patienter som behandlas med tuberkulosläkemedel kan till exempel uppvisa nedsatt växt.

MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit

MB/BacT® Antibiotic Supplement – Frystorkat supplement utformat för att innehålla amfotericin B (0,0180 % vikt/volym), azlocillin (0,0034 % vikt/volym), nalidixinsyra (0,0400 % vikt/volym), polymyxin B (10 000 enheter), trimetoprim (0,00105 % vikt/volym), vancomycin (0,0005 % vikt/volym) samt ett bulkmedel före behandling. Supplementets sammansättning kan justeras för att uppfylla specifika funktionskrav. Rekonstituera med 10,0 ml MB/BacT rekonstitueringsvätska.

MB/BacT® Reconstitution Fluid – Oleinsyra (0,05 % vikt/volym), glycerol (5 % vikt/volym), amarant (0,004 % vikt/volym) och bovint serumalbumin (1 % vikt/volym) i renat vatten. Flaskornas totala fyllnadsvolym är 15 ml. Rekonstitueringsvätskans sammansättning kan justeras för att uppfylla specifika funktionskrav.

Ytterligare material som behövs

MB/BacT eller BacT/ALERT 3D system för detektering av mykobakterier
Sterilt destillerat eller avjoniserat vatten
Middlebrook 7H11 eller annat agar- eller äggbaserat medium för odling av mykobakterier
Autoklav
N-acetyl-L-cystein i pulverform
Steril 0,067 M fosfatbuffert, pH 6,8
Centrifug
CO_2-inkubator, 37 °C
Sterila sprutor med kanyl med kanylskydd eller skyddshylsa
Sterila pipetter eller andra sterila kanylfria inokulationsanordningar för flaskor med avtagbara förslutningar
BacT/ALERT® Reseal för system med avtagbara förslutningar
Mykobakteriedödande desinfektionsmedel
Alkoholtorkar
Vortexmixer
Sterila koniska centrifugrör av polypropylen (50 ml)
Biologisk säkerhetsbänk
Sterila engångshandskar
Engångskläder
Engångsmasker
Mikroskop
Material för färgning av objektglas
Kvalitetskontrollorganismer

Material som kan beställas från bioMérieux

MB/BacT system för detektering av mykobakterier och BacT/ALERT system för detektering av mikrober

Försiktighetsåtgärder

1. POTENTIELLT INFEKTIÖST PROV. Iakttag generella försiktighetsåtgärder vid hantering och kassering av infektiöst material.
2. Vid hantering av *M. tuberculosis*-komplexorganismer som odlas på medium krävs förfaranden enligt biosäkerhetsnivå 3, spridningsskyddande utrustning och anläggningar.[9]
3. Alla inokulerade BacT/ALERT MP-odlingsflaskor, provtagningsutrustning, injektionssprutor, pipetter eller andra nålfria anordningar för inokulering ska dekontamineras enligt rutinerna vid din institution.[2]
4. I händelse av spill eller läckage kan en aerosol med mykobakterier (inklusive *M. tuberculosis*) eller andra bakterier genereras. Följ de särskilda säkerhetsföreskrifterna som utfärdats av din institution och CDC/NIH.[9] Fenolhaltiga desinfektionsmedel som Amphyl® är lämpliga medel för dekontaminering av mykobakterier och andra mikroorganismer.
5. Dessa odlingsflaskor får endast användas av utbildad laboratoriepersonal.

Förvaringsanvisningar

BacT/ALERT MP-odlingsflaskor och MB/antibiotikasupplementkit ska förvaras i kylskåp (2–8 °C). Skydda mot direkt solljus. BacT/ALERT MP-odlingsflaskor måste värmas till rumstemperatur (30–60 minuter) innan de används. Utgångsdatum är tryckt på varje flasketikett. Använd inte odlingsflaskorna efter sista dagen i angiven månad.

INSTRUMENT

Läs igenom användarhandboken till BacT/ALERT system för detektering av mikrober, samt tillägget till användarhandboken för MB/BacT före användning.

PROVTAGNING OCH BEREDNING AV PROVER

Korrekt provtagning, transport, hantering och beredning är extremt viktigt för korrekt analys av patientodlingar med avseende på eventuellt närvarande mykobakteriearter. Proverna ska tas och behandlas enligt Clinical Microbiology Procedures Handbook[10] eller enligt anvisningarna i laboratoriets handledning. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid rekommenderas för bearbetning av osterila prover.

OBS! bioMérieux rekommenderar att slutgiltigt pH för inokulatprovet ska ligga mellan 6,8 och 7,2.

FÖRFARANDEN

1. Före användning ska BacT/ALERT MP-odlingsflaskor inspekteras för tecken på skador eller annan försämring (missfärgning). Flaskor som uppvisar tecken på skador, läckage eller annan försämring ska kasseras. Odlingsmediet ska ha ett klart utseende, utfällningar kan dock bildas vid temperaturer under 20 °C. Förväxla inte utfällningar med grumlighet. Flaskor med grumligt medium, högt gastryck eller en gul sensor ska ej användas; dessa fynd kan vara tecken på kontaminering.
2. Före användning ska alla MB/BacT MP-flaskor med rekonstitueringsvätska inspekteras med avseende på tecken på skador eller kontaminering. Flaskor som visar tecken på läckage ska inte användas.
3. Före användning ska alla MB/BacT-antibiotikasupplementampuller inspekteras med avseende på sprickor eller nedbrytning av kakan. Använd inte ampuller som är spruckna eller uppvisar tecken på nedbrytning.
4. Om flaskan ska inokuleras utan att förseglingen tas av ska sprutor försedda med kanyl med skyddshylsa användas för inokulering.
5. Inokulerade flaskor ska alltid bäras i ställ eller korg.

Beredning av MB/BacT antibiotikasupplement

Använd aseptisk teknik och tillsätt före användning 10 ml MB/BacT rekonstitueringsvätska till varje flaska med MB/BacT antibiotikasupplement som ska användas. Låt kakan lösas upp. Snurra försiktigt för hand så att innehållet blandas.

OBS!
- En flaska rekonstituerat MB/BacT antibiotikasupplement räcker till 20 BacT/ALERT MP-odlingsflaskor.
- Efter rekonstituering är MB/BacT antibiotikasupplement hållbart i 7 dagar vid förvaring vid 2–8 °C. Utgångsdatum för det rekonstituerade supplementet bör antecknas på ampullens etikett.
- Överbliven rekonstitueringsvätska kan förvaras vid 2–8 °C för senare användning till sterila prover.

Beredning och inokulering av flaskor

OBS! Vidta försiktighetsåtgärder för att förhindra kontaminering både vid beredning av flaskan och inokulering av patientprovet.

1. Märk varje BacT/ALERT MP-odlingsflaska med relevant patientinformation. Symbolerna på flasketiketten (☺,#,⏲) kan definieras av användaren. Före inokulering måste flaskorna ha värmts till rumstemperatur (30–60 minuter).
2. Desinficera membranet med en alkoholtork eller liknande. Låt membranet torka innan det rekonstituerade antibiotikasupplementet eller rekonstitueringsvätskan tillsätts till flaskan.
3. Före inokulering ska aseptiskt tillsättas 0,5 ml rekonstituerat MB/BacT antibiotikasupplement till varje BacT/ALERT MP-odlingsflaska som ska användas för odling av osterila prover, eller enbart 0,5 ml MB/BacT rekonstitueringsvätska till varje BacT/ALERT odlingsflaska som ska användas för odling av sterila prover. MB/BacT-rekonstitueringsvätska innehåller komponenter som är nödvändiga för att säkerställa optimal växt av mykobakterier som kan finnas närvarande i patientprovet.
   a. Överför med aseptisk teknik det rekonstituerade antibiotikasupplementet eller rekonstitueringsvätskan till varje BacT/ALERT MP-odlingsflaska.
   b. En rosa färgskiftning i odlingsmediet är tecken på att supplementet eller rekonstitueringsvätskan tillsatts på rätt sätt.

OBS! Följande steg måste utföras i en biologisk säkerhetsbänk av person iförd lämplig skyddsklädsel för uppfyllande av de säkerhetsstandarder som utfärdats av CDC/NIH i riktlinjerna för biosäkerhetsnivå 3.[9]

Inokulering utförd med nålar med skydd

1. Dra upp varje behandlat eller sterilt patientprov med hjälp av en spruta försedd med kanylskydd eller skyddshylsa och överför med aseptisk teknik 0,5 ml till korrekt märkt BacT/ALERT MP-odlingsflaska. Luftning krävs ej. En parallell inokulering av ett konventionellt, fast odlingsmedium rekommenderas. Resten av det behandlade provet kan förvaras i kylskåp (2–8 °C) för senare användning.
2. Torka av flaskornas lock med en kompress indränkt med 2 % Amphyl (eller annat godkänt mykobakteriedödande desinfektionsmedel). Låt flaskorna torka innan de tas ut ur den biologiska säkerhetsbänken.
3. Se till att reagenser och prov blandas ordentligt i BacT/ALERT MP-flaskan.

Inokulering utförd med nålfria anordningar

Obs! Vidta försiktighetsåtgärder för att förhindra kontaminering både vid beredning av flaskan och inokulering av patientprovet.

1. Om metoden med aseptisk inokulering med kanylfri anordning väljs, ska anvisningarna nedan följas efter att antibiotikasupplement eller rekonstitueringsvätska tillsatts aseptiskt till flaskan enligt beskrivningen i denna bipacksedel.
2. Ta av metallförseglingen genom att dra fliken i mitten tvärs över flasklocket och nedåt över förseglingskanten. Undvik att dra loss mittfliken helt från förseglingen. Fortsätt att dra fliken runt flaskan så att förseglingen lossnar helt från flaskan.

   FÖRSIKTIGHET: Avlägsna metallförseglingen försiktigt. Försök inte att ta av förseglingen för hand om dragfliken lossnar helt från förseglingen och efterlämnar vassa kanter. Använd i stället en peang eller annat mekaniskt instrument.
3. Avlägsna membranet med aseptisk teknik efter att metallförseglingen tagits av. Det kan vara lättare att ta av membranet om man bänder loss det från flaskan på vardera sidan om membranslitsen.
4. Inokulera provet aseptiskt i flaskan med hjälp av en kanylfri anordning.
5. Sätt tillbaka membranet i flaskan med aseptisk teknik, och kontrollera att det passar ordentligt i öppningen. Sätt på en Reseal-förseglingen (BacT/ALERT® Reseal) över membranet och flasköppningen. Reseal-förseglingen måste passa runt flaskkanten, och undersidan på förseglingen måste vara helt i kontakt med membranets ovansida. Reseal-förseglingen måste smita tätt an mot flaskan.
6. Se till att reagenser och prov blandas ordentligt i BacT/ALERT MP-flaskan.

Analysförfarande

1. Sätt in de inokulerade BacT/ALERT MP-odlingsflaskorna i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D-instrumentet enligt anvisningarna i tillämplig användarhandbok.
2. När odlingsflaskorna har satts in i instrumentet ska de stå kvar i 42 dygn eller tills de betecknas som positiva.
3. Så snart instrumentet anger att en positiv flaska detekterats, ska flaskan tas ut i enlighet med de procedurer som finns i användarhandboken till BacT/ALERT.
4. Från alla flaskor som betecknas som positiva bör prov tas för fortsatt undersökning av utstryk och för utodling av syrafasta stavar. Utodling kan utföras genom uttagning av prov med hjälp av kanyl och spruta från flaskor med eller utan påsatt Reseal-försegling.
   a. **Provtagning för utodling från positiva flaskor utan Reseal-försegling med hjälp av nål och spruta.** Blanda flaskinnehållet i en biologisk säkerhetsbänk, desinficera flaskproppen och ta ut prov för syrafast färgning och utodling. Desinficera flaskproppen efter uttagning av prov för utodling.
   b. **Provtagning för utodling från positiva flaskor förseglade med Reseal.** Dra bort mittfliken från Reseal-förseglingen och ta av förseglingen helt från flaskan. Efter att membranet avlägsnats aseptiskt kan prov tas ut från flaskan. Om flaskan ska behållas för ytterligare analys ska proppen sättas tillbaka aseptiskt och en ny Reseal-försegling sättas på över proppen på flaskan.

   Gå vidare med de specifika förfaranden för identifiering av mykobakterier som används vid din institution om det syrafasta utstryket är positivt. Om det koncentrerade utstryket är negativt för syrafasta stavar bör en Gramfärgning utföras. Om både det syrafasta utstryket och Gramfärgningen är negativa, vilket tyder på ett falskt positivt resultat, ska flaskan sättas tillbaka i instrumentet och lämnas kvar där tills växt uppstår i utodlingen eller flaskan omklassificeras som positiv eller negativ. Odlingar som initialt bedömts som falskt positiva och därefter omklassificerats som positiva ska undersökas vidare med utstryk och odlas ut.
5. Om andra bakterier än mykobakterier ses i Gramfärgningen ska hela flaskinnehållet genomgå en ny dekontamineringsprocedur och ympas på en ny BacT/ALERT MP odlingsflaska, eller kastas och ett nytt prov tas för odling. Om icke-mykobakteriella organismer växer även i den nya BacT/ALERT MP-odlingsflaskan kasserar du den och tar ett nytt prov för odling.
6. Instrumentnegativa odlingar ska vid testperiodens slut undersökas visuellt med avseende på grumlighet. Om flaskans innehåll är grumligt ska prov tas aseptiskt för syrafast färgning och utodling enligt laboratoriets rutiner. Ej grumliga flaskor kan kastas. Dekontaminera alla flaskor före kassering.
7. Instruktioner för insättning och uttagning av odlingsflaskor i/från MB/BacT och BacT/ALERT-instrumentet finns i användarhandboken.
8. **Återanvänd inte BacT/ALERT-odlingsflaskor.** Kassera inokulerade BacT/ALERT-odlingsflaskor i enlighet med laboratoriets rutiner. Autoklavering och/eller förbränning av inokulerade BacT/ALERT-flaskor är lämpligt.[9]

RESULTAT

Bestämning av positiva eller negativa odlingsflaskor görs av ett beslutsfattande datorprogram som finns i MB/BacT eller BacT/ALERT 3D system för detektion av mykobakterier. Ingen åtgärd krävs förrän instrumentet signalerar förekomst av positiva eller negativa odlingsflaskor.

Rapportering av resultat

Resultat	Rapportering
Signal +/AFB-utstryk +	Positiv för syrafasta stavar; identifiering pågår
Signal +/AFB-utstryk –	Ingen rapportering, eller provet är kontaminerat med andra organismer än mykobakterier, närvaro/frånvaro av syrafasta stavar kan inte bedömas

Preliminärsvar ska endast lämnas efter att syrafast färgning utförts.

KVALITETSKONTROLL

Ett intyg om uppfyllande av gällande krav medföljer varje förpackning med BacT/ALERT MP-odlingsflaskor och indikerar fullgod prestanda avseende växt av *M. tuberculosis* ATCC 25177 och *M. intracellulare* ATCC 13950. Efter mottagandet kan nya partier eller leveranser av BacT/ALERT MP-odlingsflaskor eller reagenser kvalitetskontrolltestas. Se CLSI/NCCLS M22-A3 för relevanta organismer för kvalitetskontroll. Följ proceduren Beredning och inokulering av flaskor:

1. Tillsätt 0,5 ml rehydrerat MB/BacT antibiotikasupplement till varje BacT/ALERT MP-odlingsflaska som ska användas för testning.
2. Inokulera representativa flaskor med 0,5 ml av kontrollorganismerna, utspädda till 10^4 CFU/ml i steril, fysiologisk koksaltlösning eller steril Middlebrook 7H9-buljong utan supplement (godkänt parti).
3. Efter att förväntade resultat erhållits kan resterande flaskor användas för analys av kliniska prover. Om förväntade resultat inte erhållits kontaktar du bioMérieux Customer Service.

Instrument

Ett BacT/ALERT-reflektansstandardkit medföljer varje instrument för kvalitetskontroll- och kalibreringsprocedurer. All kvalitetskontroll bör ingå som en del i det normala systemunderhållet. Se BacT/ALERT Användarhandbok för ytterligare information.

ANALYSENS BEGRÄNSNINGAR

Det är många variabler vid test för mykobakterier som inte praktiskt kan kontrolleras för att totalt säkerställa att erhållna resultat uteslutande beror på korrekt respektive felaktig funktion i ett odlingsmedium eller detektionssystem.

1. Odlingar som tagits för primärdiagnos efter insatt antimikrobiell behandling kan ge negativa resultat.
2. Påvisning av mykobakterier i BacT/ALERT MP-flaskorna är beroende av kvaliteten hos det tagna provet, antalet odlingsbara organismer i provvolymen och hur provet hanteras. För optimala möjligheter till påvisning av mykobakterier är det mycket viktigt att proceduranvisningarna följs.
3. Det är ofta endast få organismer i provet. I allmänhet rekommenderas att prover tas under tre dagar i följd.
4. Felaktig behandling/dekontaminering eller försenad transport av proverna kan resultera i överväxt av bakterier och kontaminerad buljongodling. En enda kvarvarande livskraftig bakterie efter behandling är nog för att hela odlingsmediet ska bli kontaminerat.
5. Föroreningar som är resistenta mot de antibiotika som ingår i MB/BacT antibiotikasupplement kan påträffas.
6. Kolonimorfologi och pigmentering ska endast fastställas på fasta medier.
7. BacT/ALERT MP-odlingsflaskor som signaleras som positiva kan innehålla en eller flera mykobakteriearter och/eller andra icke-mykobakteriearter. I blandad växt av mykobakterier i buljong kan en långsamt växande art utkonkurreras av en snabbt växande, eller så kan odlingen ha kasserats så snart den snabbväxande arten detekterades. För identifiering av förekommande mykobakterier krävs utodling och ytterligare förfaranden för att identifiera närvarande organismer. Överensstämmelse vad gäller mikroskopisk morfologi i BacT/ALERT MP-odlingsflaskor har ej fastställts.
8. Kontaminering med saprofytiska mykobakterier i ledningsvatten eller i andra laboratoriereagenser och - utrustning kan ge upphov till "kliniskt" falskt positiva resultat (påvisning av mykobakterier som ej fanns i det kliniska provet).
9. Dekontaminering med N-acetyl-L-cystein-natriumhydroxid rekommenderas. Andra metoder för dekontaminering har inte testats tillsammans med BacT/ALERT MP-odlingsmedium. Dekontaminerande reagenser med digererande effekt kan ha skadlig inverkan på mykobakterier.
10. Mykobakteriers syrafasthet kan variera med stam, odlingens ålder och andra variabler. Alla flaskor med positiv BacT/ALERT MP-signal eller som verkar grumliga ska utodlas på för mykobakterier både selektiva och oselektiva odlingsmedier. Icke-mykobakteriearter kan ge överväxt över de mykobakterier som finns närvarande. Sådana odlingsflaskor ska dekontamineras och odlas om.
11. BacT/ALERT MP-odlingsflaskor inkuberas vid 35 °C vilket utesluter påvisning av mykobakterier som kräver andra inkuberingstemperaturer (t.ex. *M. marinum, M. ulcerans* och *M. haemophilum*). Påvisning av sådana organismer kräver andra odlingsmetoder. Organismer med speciella växtkrav (t.ex. *M. haemophilum*) kan inte påvisas i BacT/ALERT MP-flaskor när dessa inkuberas vid rätt temperatur. Följande isolat har påvisats vid analytiska studier: *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium-intracellulare, M. malmoense, M. kansasii, M. simiae, M. fortuitum, M. chelonae, M. scrofulaceum, M. gordonae* och *M. xenopi*. BacT/ALERT MP-flaskornas förmåga att påvisa andra ovanliga isolat är inte känd.
12. Söndermalda vävnadsprover är svåra att inokulera i BacT/ALERT MP-odlingsflaskor med användning av sprutor och kanyler med säkerhetsskydd. För att säkerställa adekvat inokulering måste vävnadsprover finmalas tillräckligt för att adekvat inokulering av materialet ska kunna ske i BacT/ALERT MP-flaskan. Det kan också vara fördelaktigt att använda kanyler av grövre kaliber med kanylskydd, eller att ta av den avtagbara förslutningen och aseptiskt tillsätta det malda vävnadsprovet och därefter sätta på en Reseal-försegling på BacT/ALERT MP-odlingsflaskan. Om kontaminering av söndermalda vävnadsprover misstänks ska de dekontamineras och behandlas innan de tillsätts till BacT/ALERT MP-flaskor. På detta sätt optimeras möjligheten till påvisning av de mykobakterier som kan finnas närvarande.
13. Förlängd inkubering eller tillsats av Mycobactin J kan krävas vid misstanke om *M. malmoense* eller *M. genavense*. *M. malmoense* och *M. genavense* kända för att kräva längre inkubering än de tidsperioder som normalt används av många laboratorier i USA.[2]
14. Antibiotikasupplementet, som är nödvändigt för test av de flesta prover, kan hämma växten av vissa mykobakterier.
15. Falskt negativa resultat från bioMérieuxs kliniska bedömning var 0,2 %.

ANALYSENS PRESTANDA

Inokulationsstudier har utförts med användning av följande organismer vid nivåer på ≤ 10^6 CFU/flaska och ≤ 10^2 CFU/flaska.

Mikroorganism	Inokulat (CFU/flaska)	Detektionstid (dagar)[1] BacT/ALERT MP (plast)
TB-komplex		
M. tuberculosis (4 stammar)	≤ 10^6	5,6 – 10,3
	≤ 10^2	13,7 – 18,8
M. bovis (2 stammar)	≤ 10^6	7,1 – 7,8
	≤ 10^2	14,4 – 17,4
Fotokromogena (Runyoun I)		
M. kansasii (2 stammar)	≤ 10^6	7,4 – 8,8
	≤ 10^2	13,1 – 15,0
M. simiae	≤ 10^6	4,1
	≤ 10^2	8,9
Scotokromogena (Runyoun II)		
M. gordonae	≤ 10^6	14,1
	≤ 10^2	23,7
M. xenopi (2 stammar)	≤ 10^6	10,3 – 13,8
	≤ 10^2	19,9 – 25,9[2]
M. scrofulaceum (2 stammar)	≤ 10^6	12,6 – 23,3
	≤ 10^2	20,7 – NG[3]
Icke-kromogena (Runyoun III)		
M. avium (4 stammar)	≤ 10^6	4,2 – 6,8
	≤ 10^2	10,2 – 15,9
M. intracellulare (4 stammar)	≤ 10^6	5,6 – 7,1
	≤ 10^2	10,8 – 16,2
M. malmoense	≤ 10^6	15,4
	≤ 10^2	21,9
Snabbväxande (Runyoun IV)		
M. chelonae	≤ 10^6	2,2
	≤ 10^2	4,1
M. fortuitum (2 stammar)	≤ 10^6	3,5 – 4,1
	≤ 10^2	3,9 – 8,9

[1] Varje organism testades med MB/BacT antibiotikasupplement. Testning utfördes för enstaka flaskor vid ≤ 10^6 och i triplikat vid ≤ 10^2. Redovisade data utgörs av värdeområden från multipla stammar, utom för *M. simiae, M. gordonae, M. malmoense* och *M. chelonae* där data för en individuell organism anges.
[2] En av tre flaskor visade ingen växt efter 42 dagar; det angivna värdet är medelvärdet av två flaskor.
[3] En testad organism visade ingen växt i tre av tre flaskor efter 42 dagar.

REFERENSER

1. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2007. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376).
2. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ, Jr.: Mycobacterium, in Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 7. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999, pp 399-437.
3. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2007. With Chartbook on Trends in the Health of Americans. Hyattsville, MD: 2007.
4. Eisenstadt J, Hall GS, Gibson SM, et al: Mycobacterium tuberculosis and other nontuberculosis mycobacteria, in Mahon CR, Manuselis G Jr (eds): *Textbook of Diagnostic Microbiology.* Philadelphia, PA, Saunders, 1995, pp 635-676.
5. Roberts GD, Koneman EW, Kim YK: Mycobacterium in Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, ed 5. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1991, pp 304-339.
6. Essential components of a tuberculosis program: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR* 1995;44 (No. RR-11):13.
7. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al: The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Micro* 31(4): 767-770, 1993.
8. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, et al: BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Micro* 1990;28(7),1608-1612.
9. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Fifth Edition. US Government Printing Office. Washington: Feb 2007.
10. Della-Latta P (ed): Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing, in Isenberg HD (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. Washington, DC, ASM Press; 2004 sect 7.

BESTÄLLNINGSINFORMATION

bioMérieux

BacT/ALERT® MP	100/låda	REF 259797
MB/BacT® Antibiotic Supplement Kit	100 tester/kit	REF 259760
MB/BacT® Antibiotic Supplement	5 ampuller/kit	
MB/BacT® Reconstitution Fluid	5 ampuller/kit	
BacT/ALERT® Reseal	100 enheter/kartong	REF 259787

För teknisk assistans i USA, kontakta bioMérieux Customer Service på 1-800-682-2666. Utanför USA, kontakta lokal representant för bioMérieux.

bioMérieux, den blå logotypen och BacT/ALERT är patentsökta och/eller registrerade varumärken som tillhör och används av bioMérieux SA eller något av dess dotterbolag.

Amphyl är ett registrerat varumärke som tillhör Linden Corporation.

ATCC är ett registrerat varumärke som tillhör American Type Culture Collection.

bioMérieux, Inc.
Box 15969
Durham, North Carolina 27704-0969

EC REP bioMérieux, S.A.
69280 Marcy-l'Etoile France
www.biomerieux.com

©BIOMÉRIEUX 2000, 2004, 2007, 2008

Juli 2008

EN Consult Instructions for Use DA Se brugsanvisning DE Gebrauchsanweisung beachten EL Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης ES Consulte las instrucciones de uso FR Consulter les instructions d'utilisation IT Consultare le istruzioni per l'uso NO Se bruksanvisningen PL Sprawdź w instrukcji obsługi PT Consulte as instruções de utilização ptBR Consulte as instruções de uso SV Se handhavandebeskrivningen	EN Use by DA Holdbar til DE Verwendbar bis EL Ημερομηνία λήξης ES Fecha de caducidad FR Utiliser jusque IT Utilizzare entro NO Brukes før PL Użyć przed PT Prazo de validade ptBR Usar até SV Använd före
EN Temperature limitation DA Temperaturbegrænsning DE Temperaturbegrenzung EL Περιορισμοί θερμοκρασίας ES Límite de temperatura FR Limites de température IT Limiti di temperatura NO Temperaturbegrensning PL Przestrzegać zakresu temperatury PT Limites de temperatura ptBR Limitação de temperatura SV Temperaturbegränsning	EN Manufacturer DA Producent DE Hersteller EL Κατασκευαστής ES Fabricante FR Fabricant IT Fabbricante NO Produsent PL Producent PT Fabricante ptBR Fabricante SV Tillverkare
EN In Vitro Diagnostic Medical Device DA Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik DE In Vitro Diagnostikum EL In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif médical de diagnostic in vitro IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro NO In Vitro-Diagnostisk medisinsk utstyr PL Wyrób do diagnostyki In Vitro PT Dispositivo médico para diagnóstico in vitro ptBR Dispositivo médico de diagnóstico in vitro SV Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik	EN Catalog number DA Katalognummer DE Bestellnummer EL Αριθμός καταλόγου ES Número de catálogo FR Référence du catalogue IT Numero di catalogo NO Katalognummer PL Numer katalogowy PT Referência de catálogo ptBR Número de catálogo SV Artikelnummer
EN Batch code DA Lotnummer DE Chargenbezeichnung EL Αριθμός Παρτίδας ES Codigo de lote FR Code du lot IT Codice del lotto NO Batchkode PL Kod partii PT Código do lote ptBR Código do lote SV Lotnummer	EN Sterile DA Sterilt DE Steril EL Αποστειρωμένο ES Estéril FR Stérile IT Sterile NO Steril PL Jałowe PT Estéril ptBR Esterilizado SV Sterilt
EN Contains sufficient for <n> tests DA Indeholder tilstrækkeligt til <n> test DE Inhalt ausreischend für <n> Prüfungen EL Περιεχόμενο επαρκές για <v> εξετάσεις ES Contenido suficiente para <n> ensayos FR Contenu suffisant pour <n> tests IT Contenuto sufficiente per <n> saggi NO Inneholder tilstrekkelig til <n> tester PL Wystarczy na wykonanie <n> testów PT Conteúdo suficiente para <n> ensaios ptBR Conteúdo suficiente para <n> testes SV Räcker till <n> antal tester	EN Do not reuse DA Må ikke genbruges DE Nicht zur Wiederverwendung EL Μην κάνετε επαναληπτική χρήση ES No reutilizar FR Ne pas réutiliser IT Non riutilizzare NO Må ikke gjenbrukes PL Nie używać powtórnie PT Não reutilizar ptBR Não reutilize SV Återanvänd ej
EN Fragile, handle with care DA Forsigtig, kan gå i stykker DE Zerbrechlich, mit Sorgfalt behandeln EL Εύθραυστο, να χρησιμοποιείται με προσοχή ES Frágil, manipular con precaución FR Fragile, manipuler avec précaution IT Fragile, maneggiare con cura NO Lettknuselig, må behandles med forsiktighet PL Ostrożnie, kruche PT Frágil, manusear com cuidado ptBR Frágil, manusear com cuidado SV Ömtåligt, hantera med försiktighet	EN Authorized representative in the European Community DA Repræsentant i det Europæiske Fællesskab DE Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft EL Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα ES Representante autorizado en la Comunidad Europea FR Mandataire dans la Communauté européenne IT Mandatario nella Comunità Europea NO Autorisert representant i Europeiske Felleskap PL Autoryzowany przedstawiciel w Unii Europejskiej PT Representante Autorizado na Comunidade Europeia ptBR Representante autorizado na Comunidade Européia SV Auktoriserad representant inom Europeiska gemenskapen
EN Caution, consult accompanying documents DA Forsigtig, se brugsanvisning DE Achtung: Begleitdokumente beachten EL Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα ES Atención, consultar documentos adjuntos FR Attention, voir notice d'instructions IT Attenzione: vedere le istruzioni per l'uso NO Advarsel, les vedlagt dokumentasjon PL Uwaga, zapoznaj się z instrukcją stosowania PT Atenção, consultar a documentação incluída ptBR Atenção, consultar os documentos em anexo SV Se upp! Läs medföljande dokumentation	04-2008