

20.7.2015

Wichtige Informationen zur Umgebungsuntersuchung von Heater-Cooler-Unit (HCU)-Geräten auf Mykobakterien des *M. avium* complexes / *M. chimaera*

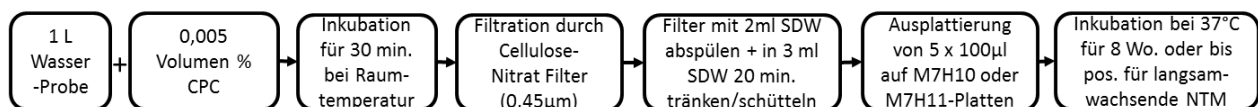
(Auszüge aus einem EU-Dokument vom 6.7.2015)

Proben:

1. Wasser-Proben (jeweils 1 L) aus der HCU: jeweils eine Probe aus den jeweiligen Tanks (Kardioplegie-Kühlkreislauf, Kardioplegie-Aufwärmkreislauf, sowie Patienten-Kreislauf); zusätzlich auch Untersuchung des filtrierten Wassers, das zur Auffüllung der jeweiligen Tanks verwendet wird.
2. Desinfektions-Lösung (50 mL), die für die Wartung der Wassertanks der HCUs verwendet wird (Kontrolle).
3. Luft (250-500 L-Proben), die innerhalb des OPs gesammelt wird, während einer Intervention mit Bypass-OP unter Verwendung der HCU. Die Luftproben-Sammler (Kompaktoren) sollten in einer Entfernung von 30 cm vor und 30 cm hinter der HCU positioniert werden. Die Luftproben-Untersuchung kann zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, sofern *M. chimaera* in den HCUs detektiert wurden.

Methode zur Prozessierung von Umwelt-Wasser-Proben zum kulturellen Nachweis von *M. chimaera*:

Zur Aufbereitung der Wasserproben wird die Filtrations-Methode empfohlen (siehe unten). Zur Dekontamination anderer zu erwartender Umwelterreger (Nonfermenter etc.) wird die Verwendung von Cetylpyridinium Chlorid (0,005%) Lösung empfohlen, da die weiter verbreitete Standard Lösung von N-Acetyl-L-Cystein Natrium Hydroxid (NALC-NAOH) oder NaOH zu einer verminderten Sensitivität bezüglich der kulturellen Detektion von MAC aus Umweltproben führt [25]. Die Wasserproben können filtriert und dann ausplattiert werden sowohl auf selektivem (antibiotika-haltigen = Standardkonzentration von Polymyxin B, Azlocillin, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Amphotericin B; Acronym: PANTA) Middlebrook 7H11- oder -7H10-Agar oder auf Eier-basierten Medien wie Löwenstein-Jensen Agar. Gleichzeitig kann parallel dazu eine Kultur in Flüssigmedium durchgeführt werden, indem 50 ml-Proben zentrifugiert und dann in das MGIT 960 System inokkuliert werden. Kultur auf Festmedium ist dem im Flüssigmedium vorzuziehen, sofern nur limitierte Ressourcen zur Verfügung stehen und nur eine Methode angewandt wird.



CPC: Cetylpyridinium chloride, (z.B. Sigma C-0732)
 Cellulose-Nitrate Filter 0,45 µm (z.B. Sartorius AG, Göttingen)
 SDW: steriles destilliertes Wasser
 M7H10: Selektiver Middlebrook 7H10 Agar
 M7H11: Selektiver Middlebrook 7H11 Agar
 NTM: Nicht-tuberkulöse Mykobakterien

Wasser-Proben sollten vorzugsweise gesammelt werden, bevor die HCU einem Desinfizierungsprozess unterworfen wird. Steriles Natrium-Thiosulfat (20mg/l) kann den Probenröhrchen, die für die Sammlung von Umwelt-Wasserproben verwendet werden, zugefügt werden, um in der Wasserprobe verbleibendes Hypochlorit zu neutralisieren. Dieser Neutralisierungsschritt war allerdings nicht erforderlich in einer Studie, in der MAC aus Trinkwasser kultiviert wurde [24].

Für weitere Informationen siehe auch den unten angehängten englischen Originaltext oder die zitierte Primärliteratur.

Samples

1. Water (1L sample) from each heater-cooler unit. In particular, samples should include the filtered water supplies used to fill each/all tanks that are part of the unit, e.g. tanks for the cardioplegia fluid cooling circuit, tanks for the cardioplegia fluid heating circuits and tanks for the patient circuits.
2. Disinfectant solutions (50 ml) used for maintenance of the water tanks of the heater cooler-units.
3. Air (250-500 L samples) collected in the operating room during cardiovascular surgical interventions with CPB and during operation of the heater-cooling units. Two sampling positions at 0.3 m from the front and at 0.3 m behind the heater-cooler unit are recommended.

The air samples may be collected during a later phase of the investigation, targeting only those centres where *M. chimaera* has been detected in water samples from the heater-cooler units.

Culture methods

The above environmental water, aerosol and solution specimens should be processed in a biosafety containment level 2 mycobacteriology laboratory as described previously [11,23,24]. Whilst NTMs are not classified as Biosafety containment level 3 pathogens, given that mycobacteriology laboratories are of this standard (required for working with *M. tuberculosis*), further culturing and characterisation of samples may be processed in such a laboratory as this is where the laboratory resources and expertise is located.

Concentration of water samples can be performed by filtration or centrifugation as described previously [23,25]. The filtration method has provided a more sensitive detection of *M. chimaera* than centrifugation (Jakko van Ingen, personal communication).

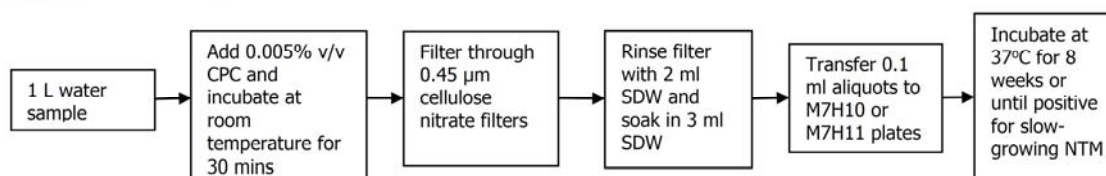
In brief, environmental water samples can be processed as schematically described in the Annex-Figure1. If available, specimen decontamination of other environmental micro-organisms by use of cetylpyridinium chloride (0.005%) solution is to be preferred to the use of the more widely available standard solution of N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide (NALC-NaOH) or NaOH, as the latter decontamination solutions have been shown to decrease the recovery of MAC from environmental samples [25]. Water samples can be filtered and plated on selective (antimicrobial agent-containing) Middlebrook 7H11 or 7H10 agar or egg-based medium such as Löwenstein-Jensen agar. In addition, culture in liquid medium can be performed in parallel, using 50 ml samples centrifuged and then inoculated in the MGIT 960 system. Solid media should be preferred for culture if resources are limited.

Water samples should be collected preferably before the device is undergoing disinfection. Sterile sodium thiosulfate (20 mg/L) can be added to the water collection vials to neutralise any remaining hypochlorite in the water sample prior to further processing. However, this neutralisation step was not found to be necessary for recovery of MAC from potable water [24].

Processing of environmental air samples of bioaerosol can be performed as described previously [11,20,26,27].

Bioaerosol can be cultured from air samples collected with a surface impaction sampler. The sampler should be calibrated to sample a certain volume of air in a given period of time and utilise standard-sized selective (antimicrobial agent-containing) Middlebrook 7H11 or 7H10 agar plates. Samples of at least 250-500 L of air are recommended.

Figure 1. Methodology for environmental water sample processing and culture for MAC/ *Mycobacterium chimaera*



Abbreviations

CPC:	Cetylpyridinium chloride
SDW	Sterile distilled water
M7H10	Selective Middlebrook 7H10 agar
M7H11	Selective Middlebrook 7H11 agar
NTM	Non-tuberculous mycobacteria

References (excerpt)

11. Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, et al. Prolonged outbreak of *Mycobacterium chimaera* infection after open chest heart surgery. Clin Infect Dis 2015; 61:67-75.
 20. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. Biomed Res Int 2014;645802.
 23. Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, Chauhan A, Chauhan SV, Katoch VM. Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in northern India. Appl Environ Microbiol 2004; 70:3751-3.
 24. Thomson R, Carter R, Gilpin C, Coulter C, Hargreaves M. Comparison of methods for processing drinking water samples for the isolation of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Appl Environ Microbiol 2008; 74:3094-8.
 25. Radomski N, Cambau E, Moulin L, Haenn S, Moillon R, Lucas FS. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. Appl Environ Microbiol 2010; 76:3514-20.
 26. Public Health England. Protocol for environmental sampling, processing and culturing of water and air samples for the isolation of slow growing mycobacteria, June 2015. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/434197/Air_water_environmental_sampling_SoP.pdf.
 27. Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA, Wallace RJ, Jr. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. J Clin Microbiol 1997; 35:3132-9.
- New:** Kohler P, Kuster SP, Bloemberg G, Schulthess B, Frank M, Tanner FC, et al. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. Eur Heart J 2015 Jul 17. doi:10.1093/eurheartj/ehv342
-