

INDEX, ÍNDICE, INDICE, ÍNDICE	
2 – 7	English
8 – 14	Español
15 – 20	Italiano
21 – 27	Français
28 – 33	Português
34 – 35	Symbols Símbolos Simboli Symboles Símbolos

English

VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

INTENDED USE

The VersaTREK Myco PZA Kit is a rapid qualitative procedure for *in vitro* susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to pyrazinamide (PZA). The VersaTREK Myco PZA Kit is used with the VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) and the ESP® Culture System II (ESP).

Appropriate inoculum sources are prepared from a liquid VersaTREK Myco seed bottle.

SUMMARY AND EXPLANATION

Rapid diagnosis of tuberculosis is important for initiation of appropriate drug therapy and institution of measures to prevent the spread of this highly contagious disease. Delayed treatment, particularly of multiple-drug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) strains, can result in treatment failure and patient mortality.¹ To address these issues, clinical microbiologists are urged to use the most sensitive and rapid diagnostic tests that provide reliable results. Experts at the CDC have made several recommendations regarding Mycobacterial testing, including the use of both a liquid and solid medium for Mycobacterial culture.²

For pyrazinamide susceptibility testing of *M. tuberculosis*, the VTI/ESP System combines a liquid culture medium (VersaTREK Myco Broth), a growth supplement (VersaTREK Myco GS), and a specific concentration of pyrazinamide with a detection system that automatically incubates and continuously monitors culture bottles inoculated with isolates of *M. tuberculosis* from a variety of specimen sources. The sponges in the VersaTREK Myco bottles provide a growth support matrix and increase the surface area exposed to headspace oxygen. The technology of the VTI/ESP System is based on the detection of headspace pressure changes within a sealed bottle due to microbial growth. A special algorithm has been developed for detection of very slow growing Mycobacteria.

With the VTI/ESP System, anti-tuberculosis drug PZA can be injected into VersaTREK Myco bottles supplemented with VersaTREK Myco GS. An inoculum of a confirmed culture of *M. tuberculosis* grown from a seed bottle is added to a drug-free control bottle, used as a positive control, and to a test bottle containing PZA. If the organism is susceptible to the drug, delayed or no microbial growth will be detected. If the organism is resistant to PZA, microbial growth will be detected by the generation of a curve exhibiting a downward excursion from the baseline. The time to detection of drug-free bottle determines when a test is complete. The drug used in this system is the primary drug, pyrazinamide, which is hydrated with an acidic rehydration buffer to a specific critical concentration. The purpose of the acidic rehydration buffer is to attain a final pH of 5.9 to 6.0, which optimizes the activity of the PZA drug. The specific drug concentration for this test is 300 µg/ml.

The detection of microbial growth in the VTI/ESP System is based on the sensitive measurement of gas production and/or gas consumption within the headspace of a sealed culture bottle. This information is used to generate a pressure curve for each bottle. An internal algorithm analyzes the information to determine the status of each test sample. When a set of conditions is met, a bottle is flagged as positive. There are approximately 10⁶ CFU/ml of Mycobacteria at the time of detection.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Susceptibility testing of *M. tuberculosis* specimens is performed with the VTI/ESP System by inoculating a suspension of organisms into VersaTREK Myco broth bottles that have been supplemented with VersaTREK Myco GS and pyrazinamide. A VersaTREK Connector is attached to each bottle to establish a closed system for monitoring the bottle with the VTI/ESP instrument. A hydrophobic membrane in the VersaTREK Connector prevents aerosolization.

Isolate information is entered into the system computer and the bottles are placed in the instrument for incubation at 35 – 37 °C under stationary conditions. VTI/ESP System detects Mycobacterial growth by continuously monitoring (every 24 minutes) the rate of consumption of oxygen within the headspace of the culture bottle and reports that growth response with a positive signal. At the end of the specified incubation period, as determined by the drug-free control bottle for each isolate that is tested, the isolate is manually determined to be susceptible or resistant to the drug.

REAGENTS

The VersaTREK Myco PZA Kit contains two bottles of the lyophilized pyrazinamide drug and four bottles of the acidic PZA Rehydration Buffer. Each drug bottle is to be rehydrated to 25 ml with the acidic rehydration buffer.

FORMULA UPON REHYDRATION*

(PRB)	Acidic PZA Rehydration Buffer	25 ml
(PZA)	Pyrazinamide	0.45% w/v
(SA)	Solubilizing Agent	1.25% w/v

*Adjusted to meet performance criteria

PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic use.
2. Refer to Material Safety Data Sheets for complete hazard information.
3. **WARNING! POTENTIAL INFECTIOUS TEST SPECIMEN.** Follow Universal Precautions and institutional policy in handling and disposing of infectious agents.
4. When working with *Mycobacterium tuberculosis* grown in culture, the recommendation is for Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.³
5. The VersaTREK Connector contains a sharp recessed needle that is sterile upon first removing the seal, but is potentially contaminated upon termination of use.

Follow institutional policy for handling and disposing of biohazard-contaminated devices. (Do not handle in a casual manner. Sterilize prior to disposal. Dispose in an approved sharps container. Do not reuse.)
6. Visually inspect all bottles for contamination, cracks or other signs of deterioration. Do not use bottles that appear turbid or cracked.
7. Use only needle locking syringes.
8. Autoclave all VersaTREK Myco bottles prior to disposal.
9. Rehydrate the lyophilized PZA drug bottles only with the acidic PZA Rehydration Buffer provided in the kit.

STORAGE

VersaTREK Myco PZA: Store at 2-8°C. Protect from light. Upon rehydration, store at 2-8°C and use within 4 weeks, or freeze at -20°C and use within 3 months. Once thawed, do not refreeze.

PROCEDURE: SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* USING THE VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materials Provided:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

Materials Required but Not Provided:

Sterile distilled or deionized water
Autoclave
Middlebrook 7H10 or other mycobacterial agar or egg-base medium, for purity checks
CO₂ incubator, 37°C
Sterile loops
Sterile tuberculin syringes with permanently attached needles
Mycobactericidal disinfectant (e.g. Amphyl™, OMNI™, etc.)
Alcohol swabs
Vortex mixer
Biological safety cabinet
Microscope
Materials for staining slides
Quality Control organism: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Myco Susceptibility Testing

1. Label each VersaTREK Myco culture bottle with identifying information. For PZA testing, 2 bottles will be used per test.
2. Disinfect the culture bottle stoppers with alcohol.
3. Aseptically add 1.0 ml of VersaTREK Myco GS to each culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe.
4. Rehydrate lyophilized PZA by aseptically adding 25 ml acidic PZA Rehydration Buffer to each drug vial. This yields a drug concentration of 4500 µg/ml.

- Aseptically add 1.0 ml of the drug to each culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe. The final concentration of pyrazinamide is 300 µg/ml. For the drug-free control bottle, add 1 ml of the acidic PZA Rehydration Buffer in place of the drug. Twenty-five tests can be performed from a single vial.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution	Volume added to Myco test bottles	Final Concentration in Test bottles
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

- The inoculum of a specimen for susceptibility testing must be confirmed as a pure culture of *M. tuberculosis* prior to PZA testing and prepared as follows:

VersaTREK Myco Seed Bottle - A 0.5 ml volume of a 1.0 McFarland equivalent created from an agar or liquid source (growth in Middlebrook 7H9 or liquid from a primary detection bottle) is aseptically injected into a VersaTREK Myco culture bottle supplemented with 1.0 ml VersaTREK Myco GS. A sterile VersaTREK Connector is placed on the bottle and the bottle is incubated in the instrument until a positive signal is determined. This seed bottle must be used within 72 hours. Remove the VersaTREK Connector and vortex for 1-2 minutes. Add 0.5 ml of a 1:10 dilution of culture from a positive VersaTREK Myco seed bottle to the appropriate culture bottles containing drug and to the drug-free growth control bottle.

- Wipe the culture bottles and stoppers with a Mycobactericidal disinfectant.
- Mix all bottles by inverting several times.
- Remove the seal from the bottom of a VersaTREK Connector. Press the needle end of the VersaTREK Connector through the culture bottle stopper. NOTE: Do not invert the culture bottle while the connector is on the bottle. Fluid in the needle may interfere with the pressure readings for the bottle.
- Place the culture bottle with the VersaTREK Connector into the instrument. Refer to the VTI/ESP System Operator's Manual for details on bottle entry.

Loading suggestion: If the sample accession number is "123", give the PZA test bottles accession numbers such as 123PC for the positive growth control, and 123P for pyrazinamide. In this way, all bottles associated with this sample accession number will be able to be searched for and located as a group.

RESULTS

For susceptibility testing using the VTI/ESP System, a test isolate is interpreted as being susceptible or resistant to a drug based on a formula. Record the time to detection of the drug-free bottle. This time is used to calculate susceptible or resistant interpretations using the following formula:

Susceptible: No growth, or the time to detection of the drug bottle is greater than three days (rounded to the nearest whole number) of the time to detection of the drug-free control bottle (rounded to nearest whole number). To round to the nearest whole number, if time ≤ XX.49 is round down and if time ≥ XX.50 is round up.

Resistant: Time to detection of drug bottle is ± three days (rounded to the nearest whole number) of the time to detection of the drug-free control bottle (rounded to the nearest whole number). To round to the nearest whole number, if time ≤ XX.49 is round down and if time ≥ XX.50 is round up.

NOTE:

- No bottle should flag positive before the third day. Bottles that flag before three days are either contaminated or the inoculum is too high. The test should be repeated.
- A test bottle may signal before the control bottle (see Table 2 Example D).

All resistant results should be confirmed by an alternate method prior to reporting.

Bottles that signal positive should be stained for AFB (Acid Fast Bacilli) and subcultured to a Middlebrook 7H10 or 7H11 agar plate, as well as a non-selective agar plate (e.g. Blood Agar) to ensure purity of the specimen. Growth control bottles that signal in less than 2.5 days may indicate the presence of a non-Mycobacterial contaminant whereas control bottles that do not signal within 12 days after being inoculated may be indicative of improper bottle preparation. For either situation, the specimen should be retested.

Mono-resistance to PZA is uncommon, therefore in the event of unexpected resistance results, verify purity and identification of the isolate.

ALWAYS review the isolate's graph before reporting. Refer to the Operator's Manual for graph analysis. If graphs for tests that have signaled positive look abnormal, contact TREK Technical Support at 1-800-642-7029 or 1-216-351-8735.

PZA Result reporting:

TABLE 1: Test Observations and Test Assessment

Test bottle	Result obtained	Possible cause	Action
Growth control	<3 days from inoculation	Possible contaminant or too heavy inoculum; check purity plates and graphs.	REPEAT TEST
Growth control*	>12 days from inoculation	Non viable organism, too light inoculum	REPEAT TEST
Growth control	Growth detected between 3 and 12 days after inoculation		Valid test - evaluate drug bottles
Purity check	No contaminants observed by at least 18 h on Blood Agar plate		Valid test
	Non-AFB organisms observed	Culture was not pure	REPEAT TEST
	No colonial variation observed on Middlebrook agar plates		Valid test- No action
	Colonial variation observed on Middlebrook agar plates	More than one species of mycobacterium is present	REPEAT TEST to verify results; notify physician that final results are pending

*The upper range of 12 days detection time for the growth control was established by clinical and in-house data.

Be sure to check the subculture results on the mycobacterial agar to verify that only one species of mycobacterium was present, especially in the case of a resistant result.

TABLE 2: Examples of Results

Patient	A	B	C	D	E	F	G
PZA Control Positive (Days)	2	4	5	9	10	12	13
PZA Drug Positive (Days)	5	2	6	7	14	No Growth	14
Result	Invalid Growth Control, Repeat Test	Invalid, Repeat Test	Resistant*	Resistant*	Susceptible	Susceptible	Invalid Growth Control, Repeat Test

*All resistant results should be confirmed by an alternate method prior to reporting.

QUALITY CONTROL

A new lot number or shipment of VersaTREK Myco PZA should be tested with the quality control organism *M. tuberculosis* ATCC 27294 (PZA susceptible). Expected results are shown in Table 3. Quality control should be run once each week when susceptibility testing is performed. Observation of the proper results, within 4-15 days, indicates the reagents are ready for use in testing patient isolates.

If proper results are not observed, do not report patient's results. Repeat quality control and any patient isolates affected by the initial quality control failure. If repeat quality control does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services.

1. Add 1 ml VersaTREK Myco GS to VersaTREK Myco culture bottles.
2. Rehydrate lyophilized pyrazinamide with acidic PZA Rehydration Buffer as described under "Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Susceptibility Testing (Item 4)."
3. Add 1 ml of drug to each VersaTREK Myco bottle to yield final drug concentrations of pyrazinamide at 300 µg/ml. Add 1.0 ml PZA Rehydration Buffer to the growth control bottle.

4. Add 0.5 ml of a 1:10 dilution of culture from a positive VersaTREK Myco seed bottle to the appropriate culture bottles containing drug and to the drug-free growth control bottle.
5. After observation of expected results, use the remainder of the lot in testing specimens. If expected results are not achieved, contact VersaTREK Technical Support.

TABLE 3 Expected Quality Control Results

Organism	ATCC	Pyrazinamide
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Susceptible

The most common causes of quality control failure are over-inoculation of the PZA test sets and contamination. If repeated false resistance results are obtained, the PZA antibiotic most likely has lost activity. The recommendation is to test with a new antibiotic stock.

LIMITATIONS

1. The VersaTREK Myco PZA susceptibility test does not interpret the degree of susceptibility of the isolate being tested. It is a qualitative test.
2. The VersaTREK Myco PZA susceptibility test can only be performed on the VTI or ESP instruments. Testing cannot be performed manually.
3. Use only pure cultures of *M. tuberculosis*. The user must confirm the purity of the culture, especially if the result is resistant. Cultures that contain multiple species of Mycobacteria may give erroneous results.
4. Failure to prepare the isolates per the manufacturer's recommendation may lead to inaccurate results.
5. Failure to re-hydrate the PZA with the proper volume of acidic PZA Rehydration Buffer may give inaccurate results.
6. Thorough mixing of inoculated bottles is important. Failure to mix adequately may lead to false resistant results.
7. Failure to use the VersaTREK Myco GS growth supplement may lead to false susceptible results.

EXPECTED RESULTS

In the initial testing, a total of 96 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the VersaTREK Myco PZA Kit at five geographically diverse sites. The testing included both fresh clinical and sub-cultured isolates from liquid and solid media sources.

The repeat rates for this study was <10%. The average time to result for the VersaTREK Myco PZA susceptibility test was 8.18 days for a liquid seed inoculum, with a range from 3 to 15 days. See figure 1 below.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In house testing

Lot Reproducibility:

Lot reproducibility was performed using 4 well-characterized strains of *M. tuberculosis*, which were tested in triplicate and on three separate days. Three lots of VersaTREK Myco broth were represented in the testing. The overall reproducibility was 100% for seeded inoculum.

Eight lots of manufactured VersaTREK Myco PZA, seven VersaTREK Myco broth, and six VersaTREK Myco GS were evaluated for reproducibility with acceptable results for all lots.

CDC Challenge Panel Testing:

Ten well-characterized strains of *M. tuberculosis* were tested and compared to BACTEC 460TB and to expected results. Eight strains were susceptible and two were resistant to PZA. There was an overall 100% agreement with BACTEC and expected results.

Comparison of ESP Culture System II and VersaTREK Microbial Detection System:

Recovery of different microorganisms and time to detection was used to demonstrate no difference in performance between ESP Culture System II and VersaTREK Microbial Detection System with additional testing of *M. tuberculosis* and PZA. Results and time to detection by either system were not significantly different.

Clinical Site testing:

Clinical Evaluation:

The VersaTREK Myco PZA susceptibility test was evaluated at five geographically diverse sites composed of regional reference centers, public health laboratories, and university hospital-based laboratories. The VersaTREK Myco PZA Kit was compared to the BACTEC 460TB PZA susceptibility test method.

Reproducibility Testing:

Lot reproducibility was performed using two well-characterized strains of *M. tuberculosis* from CDC using two lots each of VersaTREK Myco broth and VersaTREK Myco GS. Testing was performed in triplicate and on three separate days. The overall reproducibility was $\geq 95\%$ for seeded inoculum.

Challenge Testing:

CDC challenge set of 30 organisms was tested at three sites. Of the possible 90 test points, only 77 were valid. The lower number of tests (7.2% repeat rate) was due to no growth, contamination or instrument issues. Of the 77 organisms tested, 68 were susceptible and 9 were resistant. There was an overall agreement of 98.7% with expected results

Clinical Isolate Testing using Seed Inocula

Susceptibility tests of *Mycobacterium tuberculosis* were performed on 96 isolates from a liquid inoculum source.

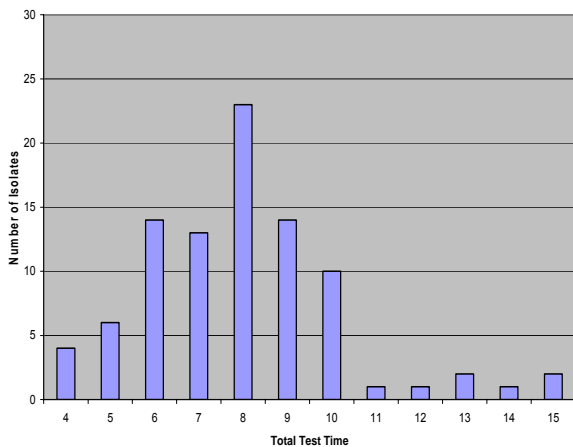
Table 4 presents the results from clinical isolate testing for PZA at 300 $\mu\text{g/ml}$ for ESP and 100 $\mu\text{g/ml}$ for BACTEC. Testing showed 11 discordant results for seeded inoculum. Of the 11 discordant results from seeded inoculum, 10 were resistant for ESP/VTI and susceptible for BACTEC; and one was susceptible for ESP/VTI and resistant for BACTEC.

Table 4. Clinical Isolate Results- VersaTREK Myco PZA susceptibility test compared to BACTEC 460TB susceptibility.

		BACTEC 460TB System		ESP/VTI System			
		Expected Results		Susceptible		Resistant	
Source	# Tests	S	R	# Agree	Category Agreement % (95% CI) ^a	# Agree	Category Agreement % (95% CI)
Liquid	96	83	13	73	88 (79-94.1)	12	92.3 (64-99.8)

a. 95% Confidence Intervals (CI). Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figure 1. Total test time for seeded inoculum preparation for VersaTREK Myco PZA Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*



HAZARD INFORMATION

Pyrazinamide

Xn	Harmful
R22	Harmful if swallowed.
S20	When using do not eat or drink.
S36	Wear suitable protective clothing.
S46	If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

REFERENCES

1. Stratton, C.W. 1992. The resurgence of tuberculosis. Inf. Dis. Newsl. 11:73-80.
2. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsberg, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J. Clin. Microbiol. 31:767-770.
3. CDC/National Institutes of Health, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Edition Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC and NIH, 1999; DHHS publication no. (CDC) 93-8395.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BACTEC is a trademark of Becton Dickinson and Company

ESP and VersaTREK are trademarks of TREK Diagnostic Systems, Inc.



For additional information call TREK Technical Support at 1.800.642.7029 or 1-216-351-8735.



TREK Diagnostic Systems
982 Keynote Circle, Suite 6
Cleveland, Ohio 44131
USA
800.871.8909
www.trekds.com



TREK Diagnostic Systems
Units 17 – 19, Birches Industrial Estate
East Grinstead
West Sussex, RH19 1XZ
UK

L-TDST015-7
2010-07

VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

APLICACIONES PREVISTAS

El VersaTREK Myco PZA Kit es un sistema cualitativo rápido, que se emplea para realizar *in vitro* la prueba de sensibilidad a la pirazinamida (PZA) de la *Mycobacterium tuberculosis* a partir de un cultivo. El VersaTREK Myco PZA Kit se utiliza en combinación con el VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) y el ESP® Culture System II (ESP).

Las fuentes de inoculante se preparan a partir de un frasco de material activo líquido VersaTREK Myco.

RESUMEN Y DESCRIPCIÓN

El diagnóstico precoz de la tuberculosis resulta esencial para poder iniciar un tratamiento farmacológico adecuado y poner en práctica una serie de medidas destinadas a evitar la propagación de esta enfermedad altamente contagiosa. El tratamiento tardío, en especial de numerosas cepas de *M. tuberculosis* (MDR-TB) resistentes a los fármacos, puede provocar la ineficacia del tratamiento y el aumento de la tasa de mortalidad en los pacientes.¹ Para hacer frente a esta situación, los microbiólogos clínicos están obligados a utilizar las pruebas de diagnóstico de mayor sensibilidad y rapidez, que al mismo tiempo ofrezcan los resultados más fiables. Los expertos de los CDC (Centros para el Control de Enfermedades de Estados Unidos) han realizado una serie de recomendaciones acerca de los análisis micobacterianos, entre las que se incluye el uso de dos medios: el líquido y el sólido, para los cultivos micobacterianos².

Para realizar la prueba de sensibilidad a la pirazinamida de la *M. tuberculosis*, el sistema VTI/ESP combina un medio de cultivo líquido (VersaTREK Myco Broth), un complemento para el crecimiento (VersaTREK Myco GS) y una concentración específica de pirazinamida, con un sistema de detección que incuba de forma automática y supervisa de forma continuada los frascos de material activo inoculadas con los aislados de *M. tuberculosis*, a partir de una gran variedad de fuentes de muestra. Las esponjas de los frascos de VersaTREK Myco aportan una matriz de soporte para el crecimiento y permiten aumentar la superficie expuesta al oxígeno del espacio libre superior. La tecnología del sistema VTI/ESP se basa en la detección de los cambios a causa del crecimiento microbiano originados en la presión del espacio libre superior del interior de un frasco cerrado herméticamente. Se ha desarrollado un algoritmo especial para la detección de las micobacterias de crecimiento muy lento.

Gracias al sistema VTI/ESP, la PZA, un fármaco empleado en el tratamiento de la tuberculosis, se puede inyectar en los frascos de VersaTREK Myco que lleven incorporado el VersaTREK Myco GS. Se añadirá a un frasco testigo que no incorpore el fármaco, además de a un frasco de prueba que contenga PZA, un inoculante del cultivo confirmado de *M. tuberculosis* que se haya desarrollado en un frasco de material activo. Si el organismo es sensible al fármaco, no se registrará crecimiento microbiano o será retardado. Si el organismo es resistente a la PZA, se detectará el crecimiento microbiano por medio de la generación de una curva con una tendencia descendente a partir de la línea de base. El tiempo empleado en la detección del frasco que no contiene el fármaco servirá para determinar cuándo finalizará el análisis. El fármaco utilizado en este sistema es el fármaco primario, la pirazinamida, cuya hidratación se realiza por medio de una solución amortiguadora ácida hasta alcanzar una concentración específica. El objetivo del uso de esta solución amortiguadora ácida es que el valor del pH final sea de 5,9 o 6,0, un valor que servirá para optimizar la actividad del fármaco PZA. La concentración específica de fármaco para esta prueba es de 300 µg/ml.

La detección del crecimiento microbiano en el sistema VTI/ESP se basa en la medición precisa de la producción o del consumo de gas en el espacio libre superior de un frasco de cultivo cerrado herméticamente. Esta información se utiliza para generar una curva de presión por cada frasco. Por medio de un algoritmo interno se analiza la información para determinar el estado de cada una de las muestras de que consta el análisis. Si se cumplen una serie de condiciones, el frasco se marca como positivo. Se identifican aproximadamente 10⁶ UFC/ml de micobacterias en el momento de la detección.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba de sensibilidad de las muestras de *M. tuberculosis* se realiza a través del sistema VTI/ESP, gracias a la inoculación de una suspensión de organismos en los frascos de caldo de cultivo VersaTREK Myco a las que se ha incorporado el VersaTREK Myco GS y la pirazinamida. Se conecta un VersaTREK Connector a cada una de los frascos para establecer un sistema de vigilancia estrecha del frasco por medio del instrumento VTI/ESP. El VersaTREK Connector cuenta con una membrana hidrófoba que evita que se produzca aerosolización.

La información relativa a los aislados se introduce en el ordenador del sistema y los frascos se colocan en el instrumento para someterlos a incubación, a una temperatura de 35 – 37 °C, en condiciones estables. El sistema VTI/ESP detecta el crecimiento micobacteriano por medio de la supervisión constante (cada 24 minutos) de la tasa de consumo de oxígeno registrada en el espacio libre superior del frasco de cultivo e informa de la respuesta de crecimiento con una señal positiva. Una vez que finalice el periodo de incubación determinado por los frascos testigo sin fármaco de cada uno de los aislados analizados, se establece de forma manual si el aislado será sensible o resistente a dicho fármaco.

REACTIVOS

El VersaTREK Myco PZA Kit contiene dos frascos de pirazinamida liofilizada y cuatro frascos de solución rehidratante ácida PZA. Cada frasco del fármaco se rehidrata hasta 25 ml por medio de la solución amortiguadora ácida.

FÓRMULA TRAS LA HIDRATACIÓN*

(PRB)	Solución amortiguadora rehidratante ácida PZA	25 ml
(PZA)	Pirazinamida	0.45% w/v
(SA)	Agente solubilizante	1.25% w/v

*Ajustado para cumplir los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

1. Para aplicaciones de diagnóstico in vitro.
2. Consulte las Hojas de Información de Seguridad del Material para obtener información completa sobre los riesgos.
3. ¡ADVERTENCIA! MUESTRA DE PRUEBA POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Siga las precauciones universales y la normativa del centro a la hora de manipular y desechar los agentes infecciosos.
4. A la hora de trabajar con la *Mycobacterium tuberculosis* que se ha desarrollado en el cultivo, se recomienda utilizar el Nivel de Bioseguridad 3 en cuanto a manejo, contención, equipamiento e instalaciones.³
5. El VersaTREK Connector contiene una aguja embutida y afilada, esterilizada hasta que se retira el precinto pero que se puede contaminar después del uso.

Respete la normativa institucional estipulada para el manejo y la eliminación de los dispositivos contaminados biológicamente. (No manipule los instrumentos de forma despreocupada. Realice una esterilización antes de desechar. Deseche en un contenedor autorizado. No vuelva a utilizar los dispositivos.)

6. Verifique visualmente todos los frascos en busca de contaminación, grietas u otros signos de deterioro. No utilice frascos que estén turbios o dañados.
7. Utilice sólo jeringuillas con bloque de aguja.
8. Esterilice en el autoclave todos los frascos de VersaTREK Myco antes de desecharlos.
9. Rehidrate los frascos de PZA liofilizada mediante la PZA Rehydration Buffer que se incluyen en el kit.

ALMACENAMIENTO

VersaTREK Myco PZA: Guarde a 2-8°C. Proteja de la luz. Después de la rehidratación, guarde a 2-8°C y use antes de 5 días; si es alícuota, guarde a -20°C y use antes de 3 meses. Una vez descongelado, no lo vuelva a congelar. Store at 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZANDO EL VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materiales suministrados:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiales necesarios pero no suministrados:

Agua destilada o desionizada estéril
Autoclave
Middlebrook 7H10 u otro agar micobacteriano o caldo de cultivo basado en huevos
Incubadora CO₂, 37°C
Bucles estériles
Jeringuillas de tuberculina estériles con agujas permanentemente colocadas
Desinfectante micobactericida (ej.: AmphyTM, OMNITM, etc.)
Tampones de alcohol
Mezclador de vórtice
Armazón de seguridad biológica
Microscopio
Materiales para muestras de tinción
Organismo de control de calidad: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

Inoculación de frascos de cultivo VersaTREK Myco para la pruebas de sensibilidad a micobacterias

1. Etiquete cada una de los frascos de cultivo VersaTREK Myco con una información identificativa. En la prueba de la PZA, se utilizarán dos frascos por prueba.
2. Desinfecte los tapones de los frascos de cultivo con alcohol.
3. Agregue en condiciones asépticas 1,0 ml de VersaTREK Myco GS a cada frasco de cultivo, inyectándolo a través del diafragma con una aguja y una jeringa.
4. Rehidrate el PZA liofilizado, añadiendo en condiciones asépticas 25 ml de PZA Rehydratation Buffer a cada una de las ampollas de fármaco. Después de esta operación, la concentración de fármaco será de 4500 µg/ml.
5. Agregue, en condiciones asépticas, 1,0 ml de fármaco a cada frasco de cultivo, inyectándolo a través del diafragma con una aguja y una jeringa. La concentración final de pirazinamida será de 300 µg/ml. En el caso del frasco testigo sin fármaco, añada 1 ml de PZA Rehydratation Buffer en lugar del fármaco. Se pueden realizar 25 análisis a partir de una sola ampolla.

Fármaco	Concentración de fármaco tras la reconstitución	Volumen añadido a los frascos de prueba Myco	Concentración final en los frascos de la prueba
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

6. Es necesario comprobar que el inoculante de una muestra para realizar la prueba de sensibilidad sea un cultivo puro de *M. tuberculosis* antes de proceder a la realización de la prueba PZA y prepararlo del siguiente modo:

Frasco de material activo VersaTREK Myco. Se inyecta, en condiciones asépticas, un volumen de 0,5 ml de un equivalente de 1,0 de McFarland, creado a partir de un agar o una fuente líquida (desarrollado en un Middlebrook 7H9 o del líquido de un frasco de detección primaria), en un frasco de cultivo VersaTREK Myco al que se ha añadido 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. El frasco incorpora un VersaTREK Connector y se incuba en el instrumento hasta que se produce una señal positiva. El frasco de material activo se debe utilizar en un plazo de 72 horas. Retire el VersaTREK Connector y agite en vórtice durante uno a dos minutos. Añada 0,5 ml en una dilución de 1:10 de cultivo procedente de un frasco de material activo VersaTREK Myco con resultado positivo a los frascos de cultivo adecuados que contengan el fármaco y al frasco testigo del crecimiento que no lo contenga.

7. Limpie los frascos de cultivo y los topes con desinfectante micobactericida.
8. Mezcle todos los frascos, invirtiéndolos varias veces.
9. Extraiga la junta de la parte inferior de un VersaTREK Connector. Introduzca el extremo de aguja del VersaTREK Connector a través del tapón del frasco de cultivo. NOTA: no invierta el frasco de cultivo mientras el VersaTREK Connector esté en el frasco. El líquido en la aguja puede interferir en las lecturas de presión del frasco.
10. Coloque el frasco del cultivo en el instrumento con el VersaTREK Connector. Consulte el manual del usuario del sistema VTI/ESP para obtener información adicional sobre la introducción de frascos.

Sugerencias para la operación de carga: Si el número de identificador de prueba es "123", asigne a los frascos de PZA números de identificación, por ejemplo 123CP, para el control del crecimiento positivo y 123P para la pirazinamida. De este modo, se podrán localizar todas los frascos asociadas a este número de identificador de prueba, así como ubicarlos dentro de un grupo.

RESULTADOS

Para realizar la prueba de sensibilidad utilizando el sistema VTI/ESP, se valorará si un aislado de prueba es sensible o resistente al fármaco, a partir de una fórmula. Anote el tiempo de detección del frasco que no contiene fármaco. Este tiempo se utiliza para calcular interpretaciones sensibles o resistentes de acuerdo con la siguiente fórmula:

Sensible: No se detecta crecimiento, o el tiempo de detección del frasco que contiene el fármaco supera en más de tres días (se redondea hasta el número entero más cercano) al tiempo de detección del frasco testigo que no lo contiene (se redondea hasta el número entero más cercano). Para redondear hasta el número entero más cercano, si el tiempo es $\leq XX.49$ se redondea a la baja y si el tiempo es $\geq XX.50$ se redondea al alta.

Resistente: El tiempo de detección de la botella del fármaco es de \pm tres días (redondeado hasta el número entero más cercano) del tiempo de detección de la botella de control libre de fármaco (redondeado hasta el número entero más cercano). Para redondear hasta el número entero más cercano, si el tiempo es $\leq XX.49$ se redondea a la baja y si el tiempo es $\geq XX.50$ se redondea al alta.

NOTA:

- Ninguna botella deberá marcar positiva antes del tercer día. Las botellas que marcan positivas antes de tres días o están contaminadas o bien el inóculo es demasiado alto. La prueba debería ser repetida.
- Una botella puede señalar antes que la botella de control (ver el ejemplo D en la Tabla 2).

Todos los resultados resistentes se deberán confirmar a través de un método alternativo antes de la elaboración del informe.

En los frascos en que se obtenga una señal positiva se debe realizar una tinción de los BAR (bacilo ácido-resistente) y un subcultivo en una placa de agar modelo Middlebrook 7H10 o 7H11, así como en una placa agar no selectiva (por ejemplo: agar sangre) para garantizar la pureza de la muestra. Es posible que los frascos testigo del crecimiento que se señalen en un plazo inferior a 2,5 días indiquen la presencia de un contaminante de origen no micobacteriano, mientras que los que no se señalen en los 12 días siguientes a la inoculación pueden indicar que la preparación de las mismas ha sido inadecuada. Si se da cualquiera de estas situaciones, las muestras se deberán someter a un nuevo análisis.

No es habitual encontrar monoresistencia a la PZA, por tanto, en caso de que se produzcan resultados de resistencia imprevistos, es necesario comprobar la pureza y la identificación del aislado.

Revise **SIEMPRE** la gráfica de los aislados antes de informar acerca de los resultados obtenidos. Consulte el manual de usuario para obtener información adicional acerca del análisis de las gráficas. Si las gráficas de las pruebas que han obtenido un resultado positivo presentan alguna anomalía, póngase en contacto con el Servicio de asistencia técnica de TREK, en el teléfono: 1-216-351-8735.

Informe de resultados de la PZA:

TABLA 1: observaciones y evaluación de la prueba

Frasco de la prueba	Resultados obtenidos	Posible causa	Acción
Control de crecimiento	<3 días desde la inoculación	Posible contaminante o inóculo demasiado fuerte; compruebe la pureza de las placas y gráficas.	REPETIR PRUEBA
Control de crecimiento*	>12 días desde la inoculación	Organismo no viable, inóculo demasiado débil	REPETIR PRUEBA
Control de crecimiento	Crecimiento detectado entre 3 y 12 días después de la inoculación		Prueba válida - evalúe los frascos con fármaco
Control de pureza	No se observan contaminantes, al menos en 18 h sobre una placa de agar sangre.		Prueba válida
	Se observan organismos no AFB	El cultivo no era puro	REPETIR PRUEBA
	No se observan variaciones coloniales en las placas de agar Middlebrook.		Prueba válida- sin acción
	Se observa una variación colonial en las placas de agar Middlebrook.	Hay más de una especie de micobacteria presente	REPETIR PRUEBA para verificar los resultados; informe al médico de que los resultados finales están pendientes

*El índice superior de 12 días de tiempo de detección para el control de crecimiento se ha establecido a partir de datos clínicos e internos.

Asegúrese de comprobar los resultados de los subcultivos con el agar micobacteriano para verificar que sólo había una especie de micobacteria, especialmente en el caso de un resultado resistente.

TABLA 2: Ejemplos se resultados

Paciente	A	B	C	D	E	F	G
Control de PZA Positivo (días)	2	4	5	9	10	12	13
Fármaco PZA Positivo (días)	5	2	6	7	14	Sin crecimiento	14
Resultado	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba	Inválido. Repetir prueba	Resistente*	Resistente*	Susceptible	Susceptible	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba

*Todos los resultados de resistencia deberán ser confirmados mediante un método alternativo antes de ser informados.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario realizar el análisis con un nuevo número de lote o con una nueva remesa de VersaTREK Myco PZA, utilizando el microorganismo de control de calidad *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensible a la PZA). Los resultados esperados se muestran en la tabla 3. Es aconsejable realizar el control de calidad semanalmente, cuando se realice la prueba de sensibilidad. Si se obtienen los resultados deseados en un plazo de 4 a 15 días, será indicativo de que los reactivos se pueden empezar a utilizar para realizar análisis en los aislados de los pacientes.

Si no se obtienen resultados adecuados, no informe de los resultados obtenidos en los pacientes. Repita el control sobre aquellos aislados de pacientes que se vieran afectados por el error del control de calidad inicial. Si la repetición del control de calidad no se lleva a cabo según lo previsto, no informe de los resultados obtenidos en los pacientes. No utilice el producto hasta que se ponga en contacto con el Servicio de asistencia técnica.

1. Añada 1 ml de VersaTREK Myco GS a los frascos de cultivo de VersaTREK Myco.
2. Rehidrate la pirazinamida liofilizada con la PZA Rehydration Buffer, tal y como se describe en el apartado "Inoculación de los frascos de cultivo VersaTREK Myco para la realización de la prueba de sensibilidad (punto 4)."
3. Añada 1 ml de fármaco a cada frasco VersaTREK Myco, de modo que la concentración de pirazinamida se sitúe en 300 µg/ml. Añada 1,0 ml de PZA Rehydration Buffer al frasco testigo del crecimiento.
4. Añada 0,5 ml en una dilución de 1:10 de cultivo procedente de un frasco de material activo VersaTREK Myco con resultado positivo a los frascos de cultivo adecuados que contengan el fármaco y al frasco testigo del crecimiento que no lo contenga.
5. Después de observar los resultados estimados, utilice el resto del lote para realizar el análisis de las muestras. Si no se obtienen los resultados deseados, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de VersaTREK.

TABLA 3. Resultados previstos para el control de calidad.

ORGANISMO	ATCC	Pirazinamida
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensible

Las causas más habituales de fracaso del control de calidad son la inoculación en exceso de las partidas de PZA y la contaminación. Si se obtienen en repetidas ocasiones resultados de falsa resistencia, lo más probable es que el antibiótico PZA haya perdido actividad. En ese caso, es aconsejable realizar el análisis con una nueva reserva de antibiótico.

RESTRICCIONES

1. La prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA no resulta apropiada para interpretar el grado de sensibilidad del aislado sometido a la misma. Se trata de una prueba de carácter cualitativo.
2. La prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA únicamente se podrá realizar por medio de los instrumentos VTI o ESP. No es aconsejable realizarla de forma manual.
3. Utilice únicamente cultivos puros de *M. tuberculosis*. El usuario debe garantizar la pureza del cultivo, en particular si el resultado pone de manifiesto su resistencia. En el caso de los cultivos que contengan múltiples especies de micobacterias, es posible que se obtengan resultados erróneos.
4. Si no se respetan las recomendaciones del fabricante a la hora de preparar los aislados, es posible que se obtengan resultados inexactos.

5. So no se realiza de un modo adecuado la rehidratación de la PZA con el volumen adecuado de PZA Rehydration Buffer ácida, puede que los resultados obtenidos no sean del todo exactos.
6. Es importante mezclar cuidadosamente los frascos inoculados. Si la mezcla no se realiza del modo adecuado, es posible obtener resultados indicativos de una falsa resistencia.
7. Si no se utiliza correctamente el complemento para el crecimiento VersaTREK Myco GS, es posible que los resultados de sensibilidad estén falseados.

RESULTADOS ESPERADOS

Para el análisis inicial, se analizaron un total de 96 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con el VersaTREK Myco PZA Kit, en cinco puntos geográficos distintos. El análisis incluye a los aislados clínicos recién obtenidos y a los aislados de subcultivos procedentes de una fuente líquida o sólida.

La tasa de repetición establecida para este estudio fue del < 10%. El plazo medio para obtener los resultados de la prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA fue de 8,18 días en el caso de un inoculante activo líquido, con unos límites de 3 y 15 días. Véase la figura 1 a continuación.

CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

Análisis interno

Reproducibilidad de los lotes:

La reproducibilidad de los lotes se llevó a cabo utilizando 4 cepas perfectamente caracterizadas de *M. tuberculosis*, que fueron analizadas por triplicado en tres días distintos. Tres lotes de caldo de cultivo VersaTREK Myco quedaron representados en el análisis. La reproducibilidad total fue del 100% del inoculante activado.

Se evaluó la reproducibilidad de ocho lotes de VersaTREK Myco PZA manufacturado, de siete de caldos de cultivo VersaTREK Myco y de seis VersaTREK Myco GS, obteniéndose resultados aceptables en todos los casos.

CDC Prueba de provocación en placa:

Se analizaron diez cepas de *M. tuberculosis* perfectamente caracterizadas y se compararon con las de BACTEC 460TB y con los resultados previstos. Ocho cepas resultaron ser sensibles, y dos resistentes a la PZA. Se produjo una coincidencia total del 100% con BACTEC y con los resultados previstos.

Comparación entre el ESP Culture System II y el VersaTREK Microbial Detection System:

La recuperación de diferentes microorganismos y el tiempo empleado en la detección se utilizaron para demostrar que no existe ninguna diferencia en el rendimiento obtenido con el ESP Culture System II y el VersaTREK Microbial Detection System con el análisis adicional de la *M. tuberculosis* y la PZA. Los resultados y el tiempo empleado en la detección en el caso de ambos sistemas no resultaron significativamente distintos.

Análisis en centros clínicos:

Evaluación clínica:

La prueba de sensibilidad VersaTREK Myco PZA fue evaluada en cinco puntos geográficos distintos, compuestos por centros de referencia regionales, laboratorios de salud pública y laboratorios dependientes de hospitales universitarios. Se comparó el VersaTREK Myco PZA Kit con el sistema de análisis BACTEC 460TB PZA.

Análisis de reproducibilidad:

La reproducibilidad de lotes se llevó a cabo gracias a dos cepas perfectamente caracterizadas de *M. tuberculosis*, procedentes del CDC, y al empleo de dos lotes de caldo de cultivo VersaTREK Myco y otros dos de VersaTREK Myco GS. El análisis se realizó por triplicado en tres días diferentes. La reproducibilidad total fue del $\geq 95\%$ del inoculante activado.

Prueba de provocación:

El conjunto del CDC utilizado para la prueba de provocación y compuesto por 30 microorganismos se sometió al análisis en tres lugares distintos. Del total de 90 puntos posibles para la prueba, únicamente 77 se consideraron válidos. La reducción del número de pruebas (tasa de repetición del 7,2%) se debió a la ausencia de crecimiento, a la contaminación o a asuntos relacionados con el instrumental. De los 77 microorganismos sometidos a la prueba, 68 resultaron ser sensibles y 9 resistentes. Se produjo una coincidencia total del 98,7% en función de los resultados previstos.

Análisis clínico de aislados con uso de inoculantes activos

La prueba de sensibilidad de la *Mycobacterium tuberculosis* se realizó en 96 aislados procedentes de una fuente de inoculante líquida.

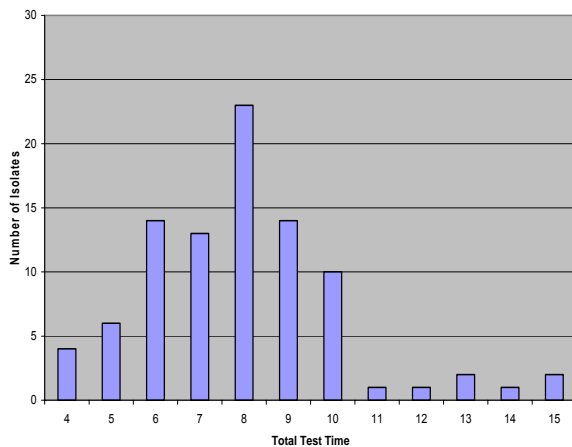
La tabla 4 muestra los resultados del análisis clínico de aislados con una concentración de PZA de 300 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del sistema ESP y de 100 $\mu\text{g/ml}$ en el del sistema BACTEC. Los análisis mostraron 11 resultados discordantes en relación con el inoculante activado. De estos 11 resultados discordantes, 10 eran resistentes a ESP/VTI y sensibles a BACTEC, y uno era sensible a ESP/VTI y resistente a BACTEC.

Tabla 4. Resultados obtenidos en aislados clínicos Prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA en comparación con los de BACTEC 460TB.

Origen	# Pruebas	Sistema BACTEC 460TB		Sistema ESP/VTI			
		Resultados previstos		Sensible		Resistente	
		S	R	# Coincidencia	Coincidencia de las categorías (%) (95% IC) ^a	# Coincidencia	Coincidencia de las categorías (%) (95% IC)
Líquido	96	83	13	73	88 (79-94,1)	12	92,3 (64-99,8)

a. Intervalos de confianza (IC) del 95%. Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figura 1. Duración total de la prueba para la preparación del inoculante activado para VersaTREK Myco PZA. Prueba de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*



INFORMACIÓN DE RIESGOS

Pirazinamida

- Xn Nocivo
- R22 Nocivo por ingestión.
- S20 No comer ni beber durante su utilización.
- S36 Úsese indumentaria protectora adecuada.
- S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.

BIBLIOGRAFÍA: pg. 8

Para obtener información adicional, llame al Servicio de Asistencia Técnica de TREK al número 1-216-351-8735.

Italiano

VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

USO PREVISTO

VersaTREK Myco PZA Kit è una tecnica qualitativa rapida per il test di sensibilità *in vitro* alla pirazinamide (PZA) del *Mycobacterium tuberculosis* in coltura. VersaTREK Myco PZA Kit viene utilizzato con VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) e con ESP® Culture System II (ESP).

Le rispettive sorgenti di inoculo vengono preparate da un flacone di coltura liquida VersaTREK Myco.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Una diagnosi rapida della tubercolosi è importante per l'istituzione della terapia farmacologica adeguata e di misure volte a prevenire la diffusione di questa malattia altamente contagiosa. Un ritardo nell'inizio del trattamento, in particolare di ceppi di *M. tuberculosis* con multiresistenza farmacologica (MDR-TB), può avere come conseguenza l'insuccesso della terapia e la morte del paziente.¹ Per far fronte a questo problema, i microbiologi clinici devono utilizzare i test diagnostici più rapidi e sensibili che forniscano risultati affidabili. Nei test per micobatteri, gli esperti del CDC raccomandano tra l'altro l'uso di terreni sia liquidi sia solidi per la coltura dei micobatteri.²

Per il test di sensibilità alla pirazinamide del *M. tuberculosis*, il sistema VTI/ESP combina un terreno di coltura liquido (VersaTREK Myco Broth), un supplemento di crescita (VersaTREK Myco GS) e una specifica concentrazione di pirazinamide con un sistema di rilevamento a incubazione automatica e monitoraggio continuo dei flaconi di coltura, inoculati con isolati di *M. tuberculosis* prelevati da una varietà di sorgenti di campioni. Le spugne nei flaconi VersaTREK Myco offrono una matrice di supporto di crescita e aumentano l'area della superficie esposta all'ossigeno presente nello spazio di testa. La tecnologia del sistema VTI/ESP è basata sul rilevamento di variazioni di pressione nello spazio di testa di un flacone sigillato, dovute alla crescita microbica. Per il rilevamento di micobatteri a crescita molto lenta, è stato realizzato uno speciale algoritmo.

Con il sistema VTI/ESP, è possibile iniettare il farmaco antitubercolare PZA in flaconi VersaTREK Myco integrati con VersaTREK Myco GS. Un inoculo di una coltura confermata di *M. tuberculosis*, cresciuto da un flacone di coltura, viene aggiunto a un flacone di controllo senza farmaco, utilizzato come controllo positivo, e a un flacone test contenente PZA. Se l'organismo è sensibile al farmaco, la crescita microbica sarà assente o ritardata. Se l'organismo è resistente alla PZA, la crescita microbica sarà messa in evidenza dalla comparsa di una curva con andamento verso il basso dalla linea di base. Il tempo di rilevamento del flacone senza farmaco determina il completamento del test. Il farmaco impiegato in questo sistema è quello primario, la pirazinamide, che viene idratata da un tampone di reidratazione acido fino a una concentrazione critica specifica. Il compito di questo tampone è di ottenere un pH finale compreso tra 5,9 e 6,0, che ottimizzi l'attività del farmaco PZA. La concentrazione specifica del farmaco per questo test è di 300 µg/ml.

Il rilevamento della crescita microbica nel sistema VTI/ESP è basato sulla misurazione sensibile della produzione e/o del consumo di gas all'interno dello spazio di testa di un flacone di coltura sigillato. L'informazione ottenuta viene utilizzata per generare una curva di pressione per ciascun flacone. Un algoritmo interno analizza l'informazione per determinare lo stato di ciascun campione del test. Quando un insieme di condizioni viene soddisfatto, un flacone è segnalato come positivo. Al momento del rilevamento, sono presenti ca. 10⁶ UFC/ml di micobatteri.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test di sensibilità di campioni di *M. tuberculosis* viene eseguito con il sistema VTI/ESP inoculando una sospensione di organismi nei flaconi con brodo VersaTREK Myco, integrati con VersaTREK Myco GS e pirazinamide. Un VersaTREK Connector viene collegato a ciascun flacone in modo da creare un sistema chiuso di monitoraggio del flacone con lo strumento VTI/ESP. Una membrana idrofobica nel VersaTREK Connector previene l'aerosolizzazione.

Le informazioni dell'isolato sono inserite nel computer del sistema e i flaconi sono collocati nello strumento per l'incubazione a 35 – 37 °C in condizioni stazionarie. Il sistema VTI/ESP rileva la crescita micobatterica mediante il monitoraggio continuo (ogni 24 minuti) della velocità di consumo dell'ossigeno all'interno dello spazio di testa del flacone di coltura e riporta la reazione a tale crescita con un segnale positivo. Al termine del periodo di incubazione specificato, determinato per ciascun isolato analizzato dal flacone di controllo senza antibiotico, viene determinato manualmente se l'isolato è sensibile o resistente all'antibiotico.

REAGENTI

VersaTREK Myco PZA Kit contiene due flaconi di pirazinamide liofilizzata e quattro flaconi di tampone acido di reidratazione della PZA. Ciascun flacone del farmaco deve essere reidratato a 25 ml con il tampone acido di reidratazione.

FORMULA IN CASO DI REIDRATAZIONE*

(PRB) Tampone acido di reidratazione della PZA	25 ml
(PZA) Pirazinamide	0,45% w/v
(SA) Agente solubilizzante	1.25% w/v

*Regolati per soddisfare i criteri di prestazione.

PRECAUZIONI

1. Per l'utilizzo diagnostico *In Vitro*.
2. Fare riferimento alla documentazione per la sicurezza dei materiali per informazioni complete sui rischi.
3. AVVERTENZA! CAMPIONE DI PROVA POTENZIALMENTE INFETTIVO. Per la manipolazione e lo smaltimento di agenti infettivi, attenersi alle normative istituzionali.
4. Durante il trattamento del *Mycobacterium tuberculosis* cresciuto in coltura, si raccomanda di attenersi alla prassi, all'equipaggiamento di sicurezza e agli impianti del Livello 3 di biosicurezza.³
5. Il VersaTREK Connector contiene un ago rientrante sterile subito dopo la rimozione del sigillo, ma potenzialmente contaminato subito dopo l'utilizzo.

Seguire la politica istituzionale per il trattamento e lo smaltimento di dispositivi contaminati da sostanze biologiche pericolose. (Maneggiare con attenzione. Sterilizzare prima dello smaltimento. Per lo smaltimento, utilizzare appositi contenitori per rifiuti con pericolo di lesione. Non riutilizzare.)

6. Verificare che nessun flacone presenti segni di contaminazione, rottura o altro segno di deterioramento. Non utilizzare flaconi dall'aspetto torbido o con segni di danneggiamento.
7. Utilizzare solo siringhe con sistema di bloccaggio ago.
8. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi di VersaTREK Myco prima dello smaltimento.
9. Reidratare i flaconi con farmaco PZA liofilizzato solo con il PZA Rehydration Buffer acido fornito nel kit.

CONSERVAZIONE

VersaTREK Myco PZA: Conservare a una temperatura di 2-8°C in luogo protetto dalla luce.

In caso di reidratazione, conservare a 2-8°C ed utilizzare entro 4 settimane, o congelare alla temperatura di -20°C e procedere all'utilizzo entro 3 mesi. Una volta scongelato, non congelare nuovamente.

PROCEDURA: TEST DI SUSCETTIBILITÀ DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZZANDO IL VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materiali forniti:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiali richiesti ma non forniti:

Acqua distillata o deionizzata sterile.
Autoclave
Middlebrook 7H10 o altro agar micobatterico o medium a base di uovo.
Incubatrice alla CO₂, a 37°C
Anse sterili
Siringhe sterili per tubercolina con aghi permanenti
Disinfettante micobatterico (cioè, Amphyl™, OMNI™, ecc.)
Tamponi imbevuti di alcool
Mescolatore vortice
Cabina di sicurezza biologica
Microscopio
Materiali per la colorazione dei vetrini
Organismo con Controllo di Qualità: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

Inoculazione di Flaconi di Coltura VersaTREK Myco per il test di suscettibilità Myco

1. Etichettare ciascun flacone di coltura VersaTREK Myco con informazioni di identificazione. Per il test alla PZA, vengono utilizzati 2 flaconi per ciascun test.

- Disinfettare i tappi dei flaconi di coltura con dell'alcol.
- Aggiungere in modo asettico 1,0 ml di VersaTREK Myco GS a ciascun flacone di coltura, iniettandolo nel setto con un ago e una siringa.
- Reidratare la PZA liofilizzata, aggiungendo in modo asettico 25 ml di PZA Rehydration Buffer acido a ciascun flacone di farmaco. Ciò produce una concentrazione di farmaco di 4500 µg/ml.
- Aggiungere in modo asettico 1,0 ml del farmaco a ciascun flacone di coltura, iniettandolo nel setto con un ago e una siringa. La concentrazione finale di pirazinamide è di 300 µg/ml. Per il flacone di controllo senza farmaco, aggiungere 1 ml di PZA Rehydration Buffer acido al posto del farmaco. Con un unico flacone, è possibile effettuare venticinque test.

Farmaco	Concentrazione di farmaco al termine della ricostituzione	Volume aggiunto ai flaconi test dei micobatteri	Concentrazione finale nei flaconi test
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

- L'inoculo di un campione per i test di sensibilità deve essere confermato come coltura pura del *M. tuberculosis* precedentemente al test alla PZA e preparato nel seguente modo:

Flacone di coltura VersaTREK Myco - Un volume di 0,5 ml di un equivalente McFarland da 1,0, creato da una sorgente agar o liquida (crescita in Middlebrook 7H9 o liquido da un flacone di rilevamento primario), è iniettata in modo asettico in un flacone di coltura VersaTREK Myc integrato con 1,0 ml di VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK Connector sterile è collocato sul flacone posto in incubazione nello strumento finché non viene determinato un segnale positivo. Il flacone di coltura deve essere utilizzato entro 72 ore. Rimuovere il VersaTREK Connector e il miscelatore vortex per 1-2 minuti. Aggiungere 0,5 ml di una coltura diluita 1:10 prelevata da un flacone di coltura positiva VersaTREK Myco agli appositi flaconi di coltura con farmaco e al flacone di controllo della crescita senza farmaco.

- Pulire i flaconi di coltura e i tappi con disinfettante micobatterico.
- Mescolare tutti i flaconi invertendo più volte.
- Rimuovere il sigillo dal flacone di un VersaTREK Connector. Posizionare l'estremità dell'ago del VersaTREK Connector nel tappo del flacone di coltura. **NOTA:** Non capovolgere il flacone di coltura mentre VersaTREK Connector si trova sul flacone. Il liquido nell'ago può interferire con le letture della pressione del flacone.
- Collocare nello strumento il flacone di coltura con il VersaTREK Connector. Per maggiori informazioni sull'inserimento del flacone, consultare il manuale d'uso del sistema VTI/ESP.

Suggerimento per il caricamento: se il numero indicatore del campione è "123", assegnare ai flaconi del test alla PZA numeri indicatori come, ad esempio, 123PC per il controllo positivo di crescita e 123P per la pirazinamide. In questo modo, sarà possibile ricercare e ordinare in un gruppo tutti i flaconi associati a questo numero indicatore del campione.

RISULTATI

Per i test di sensibilità che utilizzano il sistema VTI/ESP, l'isolato analizzato viene interpretato come sensibile o resistente a un farmaco in base a una formula. Registrare il tempo di rilevamento del flacone senza farmaco. Questo tempo è impiegato per calcolare interpretazioni di sensibilità o resistenza, utilizzando la seguente formula:

Sensibile: non si è verificata alcuna crescita, oppure il tempo di rilevamento del flacone con farmaco è superiore a tre giorni (arrotondato al numero intero più vicino) del tempo di rilevamento del flacone di controllo senza farmaco (arrotondato al numero intero più vicino). Per l'arrotondamento al numero intero più vicino procedere nel modo seguente: se il tempo è $\leq XX,49$ si arrotonda per difetto se invece $\geq XX,50$ si arrotonda per eccesso.

Resistente: il tempo di rilevazione del flacone di farmaco è \pm tre giorni (arrotondato al numero intero più vicino) del tempo necessario per rilevare il flacone di controllo che non contiene farmaco (arrotondato al numero intero più vicino). Per l'arrotondamento al numero intero più vicino procedere nel modo seguente: se il tempo è $\leq XX,49$ si arrotonda per difetto se invece $\geq XX,50$ si arrotonda per eccesso.

NOTA:

- Nessun flacone deve avere contrassegno positivo prima del terzo giorno. In tal caso i flaconi sono contaminati oppure l'inoculo è troppo grande. È necessario ripetere il test.
- Il segnale del flacone del test può comparire prima di quello del flacone di controllo (consultare la Tabella 2 esempio D).

Confermare tutti i risultati di resistenza mediante un metodo alternativo prima di riportarli.

I flaconi positivi devono essere trattati per AFB (Acid Fast Bacilli) e sottocolturali su una piastra agar Middlebrook 7H10 o 7H11, e su una piastra agar non selettiva (ad es. agar sangue), per garantire la purezza dei campioni. I flaconi di controllo della crescita che presentano un segnale in meno di 2,5 giorni, possono indicare la presenza di un contaminante non micobatterico, mentre quelli che presentano un segnale entro 12 giorni dall'inoculazione possono indicare una preparazione del flacone non corretta. In entrambi i casi, è necessario ripetere il test dei campioni.

La monoresistenza alla PZA è inconsueta; quindi, in caso di risultati di resistenza non previsti, verificare la purezza e l'identificazione dell'isolato.

Prima di riportare i risultati, riesaminare **SEMPRE** il grafico dell'isolato. Consultare il manuale d'uso per l'analisi dei grafici. Se i grafici dei test positivi sono inconsueti, contattare l'Assistenza tecnica di TREK al numero 1-216-351-8735.

Resoconto dei risultati della PZA:

TABELLA 1: Osservazioni e valutazioni dei test

Flacone del test	Risultato ottenuto	Possibile causa	Azione
Controllo di crescita	<3 giorni dall'inoculazione	Possibile presenza di contaminante o inoculo troppo pesante: controllare le piastre e i grafici di purezza.	RIPETERE IL TEST
Controllo di crescita*	>12 giorni dall'inoculazione	Microrganismo non vitale o inoculo troppo leggero	RIPETERE IL TEST
Controllo di crescita	Crescita rilevata tra i 3 e i 12 giorni dall'inoculazione		Test valido: valutare i flaconi del farmaco
Controllo di purezza	Nessun contaminante osservato per almeno 18 h sulla piastra con agar sangue		Test valido
	Osservati organismi non AFB	La coltura si è rivelata impura	RIPETERE IL TEST
	Nessuna variazione delle colonie osservata sulle piastre con agar Middlebrook		Test valido: nessuna azione
	Variazione delle colonie osservata sulle piastre con agar Middlebrook	Presenza di più specie di micobatteri	RIPETERE IL TEST per verificare i risultati. Notificare al medico che i risultati finali sono in attesa di elaborazione

*Il limite massimo di 12 giorni per il tempo di rilevamento del controllo di crescita è stato stabilito in base a dati risultanti da test clinici e interni.

Assicurarsi di controllare i risultati delle sottocolture sull'agar micobatterico per verificare che sia presente una sola specie di micobatterio, specialmente nei casi di resistenza.

TABELLA 2: esempi dei risultati

Paziente	A	B	C	D	E	F	G
Controllo positivo, PZA (giorni)	2	4	5	9	10	12	13
Farmaco positivo, PZA (giorni)	5	2	6	7	14	Nessuna crescita	14
Risultato	Controllo della crescita non valida, ripetere il test	Non valido, ripetere il test	Resistente*	Resistente*	Sensibile	Sensibile	Controllo della crescita non valida, ripetere il test

*Prima della registrazione dei dati, tutti i risultati di resistenza dovranno essere confermati da un metodo alternativo.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario analizzare un nuovo numero di lotto o di spedizione di VersaTREK Myco PZA con l'organismo di controllo qualità *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensibile alla PZA). I risultati previsti sono contenuti nella tabella 3. Effettuare il controllo di qualità una volta alla settimana durante l'esecuzione del test di sensibilità. L'osservazione dei risultati esatti, entro 4-15 giorni, indica che i reagenti sono pronti per essere utilizzati nei test sugli isolati dei pazienti.

Se non si ottengono i risultati esatti, non riportare i risultati dei pazienti. Ripetere il controllo di qualità di tutti gli isolati di pazienti relativi al primo controllo di qualità non riuscito. Se la ripetizione del controllo di qualità non offre i risultati previsti, non riportare i risultati dei pazienti. Non utilizzare il prodotto prima di avere contattato l'Assistenza tecnica.

1. Aggiungere 1 ml di VersaTREK Myco GS ai flaconi di coltura VersaTREK Myco.
2. Reidratare la pirazinamide con PZA Rehydration Buffer acido, come descritto in "Inoculazione dei flaconi di coltura VersaTREK Myco per i test di sensibilità (punto 4)".
3. Aggiungere 1 ml di farmaco a ciascun flacone VersaTREK Myco per ottenere concentrazioni finali di farmaco di 300 µg/ml. Aggiungere 1,0 ml di PZA Rehydration Buffer al flacone di controllo della crescita.
4. Aggiungere 0,5 ml di una coltura diluita 1:10 prelevata da un flacone di coltura positiva VersaTREK Myco agli appositi flaconi di coltura con farmaco e al flacone di controllo della crescita senza farmaco.
5. Al termine dell'osservazione dei risultati previsti, utilizzare il lotto rimanente per analizzare i campioni. Se non sono stati ottenuti i risultati previsti, contattare l'Assistenza tecnica di VersaTREK.

TABELLA 3 Risultati previsti di controllo qualità

Organismo	ATCC	Pirazinamide
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensibile

Le cause più comuni di un controllo di qualità non riuscito sono l'eccessiva inoculazione del materiale per il test alla PZA e la contaminazione. Se si ottengono risultati di resistenza errati, molto probabilmente l'antibiotico PZA ha perso la sua attività. Si raccomanda di eseguire il test con un altro stock dell'antibiotico.

LIMITAZIONI

1. Il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA non identifica il livello di sensibilità dell'isolato esaminato. Si tratta di un test qualitativo.
2. È possibile eseguire il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA solo sugli strumenti VTI o ESP. Non è possibile eseguire il test manualmente.
3. Utilizzare solo colture pure di *M. tuberculosis*. Confermare la purezza della coltura, soprattutto se si ottiene un risultato di resistenza. Le colture che contengono più specie di micobatteri possono dare risultati non esatti.
4. Una preparazione dell'isolato che non rispetti le indicazioni del produttore può portare a risultati imprecisi.
5. La reidratazione della PZA, effettuata senza l'esatto volume del PZA Rehydration Buffer acido, può portare a risultati imprecisi.
6. La miscelazione completa dei flaconi inoculati è importante. Una miscelazione non corretta può portare a risultati di resistenza errati.
7. L'uso non corretto del supplemento di crescita VersaTREK Myco GS può portare a risultati di sensibilità errati.

RISULTATI PREVISTI

Nel test iniziale, sono stati analizzati un totale di 96 isolati clinici di *M. tuberculosis* con VersaTREK Myco PZA Kit in laboratori di cinque località diverse. Nel test sono stati inclusi isolati clinici e sottocolturali freschi da sorgenti di terreno liquide e solide.

I tassi di ripetizione in questo studio sono stati <10%. Il tempo medio per il conseguimento dei risultati del test di sensibilità VersaTREK Myco PZA è stato di 8,18 giorni per un inoculo di coltura liquida, con un intervallo da 3 a 15 giorni. Vedere figura 1 di seguito.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Test interni

Riproducibilità del lotto:

La riproducibilità del lotto è stata eseguita utilizzando 4 ceppi di *M. tuberculosis* ben definiti, analizzati tre volte e in tre giorni diversi. Durante il test, sono stati presentati tre lotti di brodo di VersaTREK Myco. La riproducibilità complessiva è stata del 100% per inoculo di coltura.

È stata calcolata la riproducibilità di otto lotti di VersaTREK Myco PZA prodotto, sette brodi VersaTREK Myco e sei VersaTREK Myco GS con risultati accettabili per tutti i lotti.

CDC test Challenge su pannello:

Dieci ceppi ben definiti di *M. tuberculosis* sono stati analizzati e confrontati con BACTEC 460TB e con i risultati previsti. Otto ceppi erano sensibili e dieci erano resistenti alla PZA. Si è verificata una corrispondenza completa del 100% con BACTEC e con i risultati previsti.

Confronto tra ESP Culture System II e VersaTREK Microbial Detection System:

Il recupero di diversi microorganismi e il tempo di rilevamento sono stati utilizzati per dimostrare che non esistono differenze tra ESP Culture System II e VersaTREK Microbial Detection System con test aggiuntivo del *M. tuberculosis* e della PZA. I risultati e il tempo di rilevamento dei due sistemi non presentavano differenze significative.

Test clinico:

Valutazione clinica:

Il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA è stato valutato nei laboratori di cinque località diverse che comprendono centri di riferimento regionale, laboratori di salute pubblica e laboratori universitari ospedalieri. VersaTREK Myco PZA Kit è stato confrontato con il metodo del test di sensibilità BACTEC 460TB PZA.

Test di riproducibilità:

La riproducibilità del lotto è stata eseguita utilizzando due ceppi di *M. tuberculosis* ben definiti forniti dal CDC e utilizzando due lotti uno per ciascun brodo di VersaTREK Myco e VersaTREK Myco GS. Il test è stato eseguito tre volte e in tre giorni diversi. La riproducibilità complessiva è stata $\geq 95\%$ per inoculo di coltura.

Test Challenge:

Il test CDC è stato svolto su 30 organismi è stato analizzato in tre laboratori. Dei 90 possibili punti del test, solo 77 erano validi. Il numero più basso dei test (tasso di ripetizione 7,2%) non è stato provocato da alcun elemento dello strumento, della contaminazione e della crescita. Dei 77 organismi analizzati, 68 erano sensibili e 9 erano resistenti. La corrispondenza complessiva con i risultati previsti è stata del 98,7%.

Test degli isolati clinici utilizzando inoculi di coltura

I test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* sono stati eseguiti su 96 isolati prelevati da una sorgente di inoculo liquida.

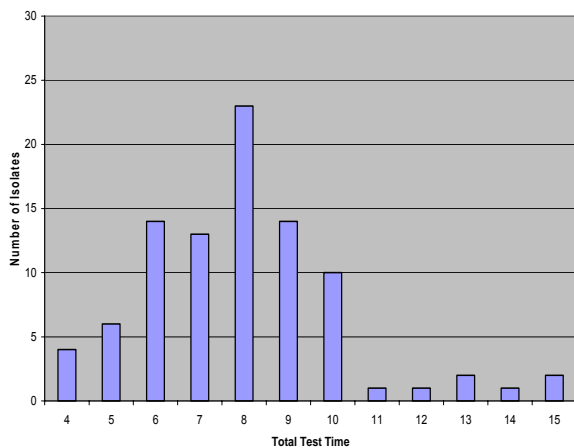
La tabella 4 presenta i risultati dei test di isolati clinici per la PZA a 300 $\mu\text{g/ml}$ per ESP e a 100 $\mu\text{g/ml}$ per BACTEC. I test hanno presentato 11 risultati discordanti per l'inoculo di coltura. Degli 11 risultati discordanti dall'inoculo di coltura, 10 erano resistenti all'ESP/VTI e sensibili al BACTEC; mentre uno era sensibile all'ESP/VTI e resistente al BACTEC.

Tabella 4. Risultati degli isolati clinici - Test di sensibilità VersaTREK Myco PZA confrontato con la sensibilità di BACTEC 460TB.

Sorgente	# Test	Sistema BACTEC 460TB		Sistema ESP/VTI			
		Risultati previsti		Sensibile		Resistente	
		S	R	# Concorde	Categoria Corrispondenza % (95% IC) ^a	# Concorde	Categoria Corrispondenza % (95% IC) ^a
Liquido	96	83	13	73	88 (79-94,1)	12	92,3 (64-99,8)

a. 95% Intervalli di confidenza(CI). Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figura 1. Tempo complessivo del test per la preparazione dell'inoculo di coltura per il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA sul *Mycobacterium tuberculosis*



INFORMAZIONI SUI RISCHI

Pirazinamide

Xn Nocivo

R22 Nocivo per ingestione

S20 Non mangiare né bere durante l'impiego.

S36 Usare indumenti protettivi adatti.

S46 In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

RIFERIMENTI: pg. 8

Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1-216-351-8735.

Français

VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

UTILISATION PRÉVUE

Le VersaTREK Myco PZA Kit est une méthode qualitative et rapide pour tester *in vitro* la sensibilité au pyrazinamide (PZA) des cultures de *Mycobacterium tuberculosis*. Le VersaTREK Myco PZA Kit est utilisé avec le VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) et l'ESP® Culture System II (ESP).

Des sources appropriées d'inoculum sont préparées à partir d'un flacon d'ensemencement VersaTREK Myco.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Un diagnostic précoce de la tuberculose est important pour initier un traitement médicamenteux approprié et instaurer des mesures visant à prévenir la propagation de cette maladie hautement contagieuse. Un traitement retardé, en particulier en cas de souches de *M. tuberculosis* (MDR-TB) multirésistantes, peut se traduire par un échec du traitement et le décès du patient.¹ Pour traiter ces problèmes, il est vivement conseillé aux microbiologistes cliniques d'utiliser les tests diagnostiques les plus rapides et les plus sensibles donnant des résultats fiables. Les experts des Centres de Contrôle des Maladies (CDC) ont émis plusieurs recommandations concernant les tests mycobactériens, y compris l'utilisation de milieux de culture mycobactérienne liquide et solide.²

Pour tester la sensibilité de *M. tuberculosis* au pyrazinamide, le système VTI/ESP associe un milieu de culture liquide (VersaTREK Myco Broth), un supplément de croissance (VersaTREK Myco GS) et une concentration spécifique de pyrazinamide avec un système de détection qui incube automatiquement et surveille en continu les flacons de culture ensemencés avec des isolats de *M. tuberculosis* provenant de diverses sources. Les tampons dans les flacons VersaTREK Myco fournissent une matrice de soutien à la croissance et augmentent la surface exposée à l'oxygène de l'espace de tête. La technologie du système VTI/ESP est basée sur la détection des modifications de la pression, dues à la croissance microbienne, dans l'espace de tête d'un flacon fermé hermétiquement. Un algorithme spécial a été élaboré pour détecter des mycobactéries se développant très lentement.

Avec le système VTI/ESP, le médicament anti-tuberculeux PZA peut être injecté dans les flacons VersaTREK Myco additionné de VersaTREK Myco GS. Un inoculum de culture confirmée de *M. tuberculosis* préparé à partir d'un flacon d'ensemencement est ajouté à un flacon de contrôle exempt de médicament, utilisé comme contrôle positif, et au flacon de test contenant du PZA. Si l'organisme est sensible au médicament, la croissance microbienne est retardée ou aucune croissance n'est détectée. Si l'organisme est résistant au PZA, la croissance microbienne est détectée par la génération d'une courbe présentant un passage au-dessous de la ligne de base. Le délai de détection dans le flacon exempt de médicament détermine la fin du test. Le médicament utilisé dans ce système est le médicament antituberculeux principal, le pyrazinamide, hydraté avec un tampon acide de réhydratation à une concentration spécifique critique. Le tampon acide de réhydratation permet d'atteindre un pH final compris entre 5,9 et 6,0, ce qui optimise l'activité du PZA. La concentration spécifique pour ce test est de 300 µg/ml.

La détection de la croissance microbienne dans le système VTI/ESP est basée sur la mesure sensible de la production et/ou de la consommation de gaz dans l'espace de tête du flacon fermé hermétiquement. Cette information est utilisée pour générer une courbe de pression pour chaque flacon. Un algorithme interne analyse les informations afin de déterminer le statut du test pour chaque échantillon. Si un ensemble de conditions est rencontré, le flacon est marqué comme étant positif. Il y a approximativement 10⁶ CFU/ml de Mycobacteria au moment de la détection.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Les tests de sensibilité des échantillons de *M. tuberculosis* sont réalisés avec le système VTI/ESP par ensemencement d'une suspension d'organismes dans les flacons de culture VersaTREK Myco qui ont été additionnés de VersaTREK Myco GS et de pyrazinamide. Un VersaTREK Connector est raccordé à chaque flacon afin de réaliser un système fermé permettant de surveiller en continu le flacon avec l'instrument VTI/ESP. Une membrane hydrophobe située dans le VersaTREK Connector empêche la production d'aérosol.

Les informations de l'isolat sont saisies dans l'ordinateur du système et les flacons sont placés dans l'instrument pour une incubation à 35 – 37 °C dans des conditions stationnaires. Le système VTI/ESP détecte la croissance mycobactérienne en contrôlant automatiquement (toutes les 24 minutes) le taux de consommation d'oxygène dans l'espace de tête du flacon de culture et indique la réponse de la croissance sous la forme d'un signal positif. À la fin de la période d'incubation spécifiée, comme indiqué par le flacon de contrôle exempt de médicament de chaque isolat testé, la sensibilité ou la résistance de l'isolat vis-à-vis du médicament est déterminée manuellement.

RÉACTIFS

Le VersaTREK Myco PZA Kit contient deux flacons de pyrazinamide lyophilisé et quatre flacons de tampon de réhydratation acide PZA. Chaque flacon de médicament doit être réhydraté avec 25 ml de tampon acide de réhydratation.

FORMULE DE RÉHYDRATATION*

(PRB) Tampon acide de réhydratation PZA	25 ml
(PZA) Pyrazinamide	0.45% w/v
(SA) Agent de dissolution	1,25 % w/v

*Adaptée pour répondre aux critères de performance.

PRECAUTIONS

1. Pour l'utilisation dans le diagnostic *in vitro*
2. Référez-vous aux Fiches de données de sécurité des produits pour obtenir des informations complètes sur les dangers.
3. ATTENTION ! ECHANTILLON TEST POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Respecter les précautions universelles et les règles professionnelles lors de la manipulation et de l'élimination des agents infectieux.
4. Lors de travaux sur du *Mycobacterium tuberculosis* poussé en culture, les normes de sécurité biologique de niveau 3 (Biosafety Level 3) concernant la manipulation, l'équipement et les locaux sont recommandées.³
5. Le VersaTREK Connector contient une aiguille pointue rétractable qui est stérile lors de l'enlèvement du conditionnement, mais potentiellement contaminée à la fin de l'utilisation.

Suivez la politique institutionnelle pour la manipulation et l'élimination de produits contaminés biologiquement. (Ne pas manipuler d'une manière « décontractée ». Stériliser avant d'éliminer. Éliminer dans un conteneur agréé pour les aiguilles. Ne pas réutiliser.)

6. Examiner visuellement les flacons à la recherche de contaminations, fissures ou autres signes de détérioration. Ne pas utiliser des flacons qui semblent opaques ou endommagés.
7. N'utilisez que des seringues à aiguille sertie si vous utilisez cette méthode d'ensemencement.
8. Passer tous les flacons VersaTREK Myco dans l'autoclave avant de les éliminer.
6. Examiner visuellement les flacons à la recherche de contaminations, fissures ou autres signes de détérioration. Ne pas utiliser des flacons qui semblent opaques ou endommagés.
7. Utiliser uniquement des seringues à aiguille verrouillée.
8. Passer tous les flacons VersaTREK Myco dans l'autoclave avant de les éliminer.
9. Réhydratez les flacons de PZA uniquement avec le PZA Rehydratation Buffer acide inclus dans le kit.

ENTREPOSAGE

VersaTREK Myco PZA : Conserver à 2-8°C. Tenir à l'abri de la lumière. Après réhydratation, conserver à 2-8°C et utiliser dans les 4 semaines, ou congeler à -20°C et utiliser dans les 3 mois. Ne pas recongeler après décongélation.

PROCÉDURE : TEST DE SENSIBILITÉ DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN UTILISANT LE VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Matériels fournis :

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

Matériels requis mais non fournis :

Eau distillée ou désionisée stérile
Autoclave
Middlebrook 7H10 ou autre gélose mycobactérienne ou milieu à base d'œuf
Incubateur à CO₂, 37°C
Anses stériles
Seringues à tuberculine stériles avec aiguilles serties.
Désinfectant mycobactéricide (par exemple Amphyl™, OMNI™, etc.)

Tamppons imprégnés d'alcool
Mélangeur de type vortex
Enceinte de sécurité biologique
Microscope
Matériels de coloration des lames porte-objets
Organisme de Contrôle Qualité: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

Ensemencement des flacons de culture de VersaTREK Myco pour le test de sensibilité Myco

1. Marquez chaque flacon de culture VersaTREK Myco avec des informations d'identification. Pour les tests PZA, 2 flacons sont utilisés par test.
2. Désinfectez les bouchons des flacons de culture avec de l'alcool.
3. Ajoutez de manière aseptique à chaque flacon de culture, 1,0 ml de VersaTREK Myco GS en l'injectant à travers le septum à l'aide d'une seringue et d'une aiguille.
4. Réhydratez le PZA lyophilisé en ajoutant de manière aseptique 25 ml de PZA Rehydration Buffer acide à chaque fiole de médicament. Ceci conduit à une concentration en médicament de 4500 µg/ml.
5. Ajoutez de manière aseptique à chaque flacon de culture, 1,0 ml de médicament en l'injectant à travers le septum à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. La concentration finale en pyrazinamide est de 300 µg/ml. Pour le flacon de contrôle exempt de médicament ajouter 1 ml de PZA Rehydration Buffer acide à la place du médicament. Vingt-cinq tests peuvent être réalisés à partir d'une seule fiole.

Médicament	Concentration du médicament après reconstitution	Volume ajouté aux flacons Myco test	Concentration finale dans les flacons du test
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300 µg/ml

6. L'inoculum d'un échantillon pour les tests de sensibilité doit être confirmé comme étant une culture de *M. tuberculosis* pure avant de tester le PZA. Il doit être préparé comme suit :

Flacon d'ensemencement VersaTREK Myco - Un volume de 0,5 ml d'un équivalent de McFarland n° 1 obtenu à partir d'une source agar ou liquide (croissance dans du milieu Middlebrook 7H9 ou du liquide d'un flacon de détection primaire) est injecté de manière aseptique dans un flacon de culture VersaTREK Myco additionné de 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK Connector stérile est placé sur le flacon et le flacon est mis à incuber dans l'instrument jusqu'à ce qu'un signal positif soit obtenu. Ce flacon d'ensemencement doit être utilisé dans les 72 heures. Enlevez le VersaTREK Connector et agitez au vortex pendant 1 à 2 minutes. Ajoutez 0,5 ml d'une dilution à 1:10 de culture provenant d'un cas positif d'un flacon d'ensemencement VersaTREK Myco aux flacons de culture appropriés contenant le médicament et au flacon de contrôle exempt de médicament.

7. Nettoyez les flacons de culture et les bouchons à l'aide d'un désinfectant mycobactéricide.
8. Mélangez le contenu de tous les flacons en les retournant plusieurs fois.
9. Retirez le joint de la partie inférieure d'un VersaTREK Connector. Poussez l'extrémité de l'aiguille du VersaTREK Connector au travers du bouchon du flacon de culture. REMARQUE : ne retournez pas la flacon de culture quand le VersaTREK Connector est fixé sur le flacon. Le liquide présent dans l'aiguille peut interférer avec les lectures de la pression du flacon.
10. Placez le flacon de culture avec le VersaTREK Connector dans l'instrument. Consultez le manuel d'utilisation du système VTI/ESP pour les détails concernant la mise en place du flacon.

Suggestion de chargement : Si le numéro d'identification de l'échantillon est « 123 », donnez au flacon de test PZA un numéro d'identification du type 123PC pour les contrôles de croissance positifs et 123P pour le pyrazinamide. De cette manière, tous les flacons associés à ce numéro d'identification d'échantillon seront recherchés et considérés en tant que groupe.

RESULTATS

Pour les tests de sensibilité réalisés avec le système VT/ESP, un isolat test est considéré comme étant sensible ou résistant à un médicament à partir d'une formule. Enregistrez le délai de détection du flacon exempt de médicament. Ce délai est utilisé pour calculer la sensibilité ou la résistance en utilisant la formule suivante :

Sensible : Pas de croissance, ou délai de détection dans le flacon contenant le médicament supérieur de plus de trois jours (arrondi au nombre entier le plus proche) au délai de détection (arrondi au nombre entier le plus proche) dans le flacon de contrôle exempt de médicament. Pour arrondir au nombre entier le plus proche, si temps \leq XX,49 il faut arrondir au chiffre inférieur et si temps \geq XX,50 il faut arrondir au chiffre supérieur.

Résistant: Le temps de détection des bouteilles de médicament est de \pm trois jours (arrondi au nombre entier le plus proche) le temps de détection de la bouteille témoin sans médicament (arrondi au nombre entier le plus proche). Pour arrondir au nombre entier le plus proche, si temps \leq XX,49 il faut arrondir au chiffre inférieur et si temps \geq XX,50 il faut arrondir au chiffre supérieur.

NOTE :

- Aucune boueille ne doit pas être repérée positive avant le troisième jour. Les bouteilles qui sont repérées avant le troisième jour sont soit contaminées, soit l'inoculum est trop élevé. L'analyse doit être répétée.
- Une bouteille de test peut être repérée avant la bouteille témoin (voir Tableau 2 exemple D).

Tous les résultats indiquant une résistance doivent être confirmés par une autre méthode avant d'être rendus.

Les flacons qui donnent un signal positif doivent faire l'objet d'une coloration AFB (Acid Fast Bacilli) et repiqués sur une plaque de gélose Middlebrook 7H10 ou 7H11, ainsi que sur une plaque de gélose non sélective (par exemple, BAP) pour s'assurer de la pureté de l'échantillon. Un flacon de contrôle de croissance qui devient positif en moins de 2,5 jours peut indiquer la présence d'un contaminant non mycobactérien alors qu'un flacon de contrôle qui ne donne pas de signal dans les 12 jours après inoculation peut indiquer une mauvaise préparation du flacon. Dans chacune de ces situations, l'échantillon doit à nouveau être testé.

Une mono résistance au PZA est peu courante, aussi dans l'éventualité de résultats indiquant une résistance inattendu, vérifier la pureté et l'identification de l'isolat.

TOUJOURS passer en revue le graphique de l'isolat avant de rendre les résultats. Consultez le Manuel d'utilisation pour l'analyse des graphiques. Si les graphiques du test présentant un signal positif ont l'air anormaux, contactez le Support Technique TREK au 1-216-351-8735.

Rapport de résultats PZA :

TABLEAU 1: Test d'observation et Test d'évaluation

Falcon Test	Résultat obtenu	Possible cause	Action
Contrôle de croissance	<3 jours à partir de l'inoculation	Contamination possible ou inoculum trop lourd; vérifier la pureté des plaques et les graphes	REPETER TEST
Contrôle de croissance*	>12 jours à partir de l'inoculation	Pas d'organismes viables, inoculum trop léger	REPETER TEST
Contrôle de croissance	Croissance détectée entre 3 et 12 jours après inoculation		Essai valable- évaluer l'antibiotique du flacon
Vérification de pureté	Pas de contamination observée à au moins 18 heures d'une gélose au sang		Test valable
	Pas d'organismes AFB observés	La Culture n'était pas pure	REPETER TEST
	Pas de colonie variée observée sur gélose de Middlebrook		Essai valable - pas d'action
	Colonies variés observés sur gélose de Middlebrook	Plus d'une espèce de Mycobactérie sont présentes	REPETER TEST pour vérifier les résultats; prévenir le physicien que les résultats finaux sont en suspens

*la gamme supérieure de 12 jours de temps de détection pour le contrôle de croissance a été établie par des données cliniques et internes.

Soyez sûr de contrôler que les résultats des sous cultures du milieu gélose pour Mycobactéries pour vérifier que seulement une espèce de Mycobactéries soit présentes, précisément dans le cas de résultats résistant.

TABLEAU 2 : Exemples of résultats

Patient	A	B	C	D	E	F	G
PZA Témoin Positif (Jours)	2	4	5	9	10	12	13
PZA Médicament Positif (Jours)	5	2	6	7	14	Pas de croissance	14
Résultat	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée	Invalide, Analyse répétée	Résistant*	Résistant*	Susceptible	Susceptible	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée

*Tous les résultats Résistant doivent être confirmés par une autre méthode avant d'être annoncés.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Tous les nouveaux lots ou envois de VersaTREK Myco PZA doivent être testés avec l'organisme *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensible au PZA) de contrôle de qualité. Les résultats attendus sont présentés dans le Tableau 3. Le contrôle de qualité doit être mis en œuvre une fois par semaine lorsque des tests de sensibilité sont réalisés. L'obtention de résultats adéquats dans les 4-15 jours indique que les réactifs sont prêts à être utilisés pour tester des isolats de patients.

Si des résultats adéquats n'ont pas été obtenus, ne rendez pas les résultats du patient. Répétez le contrôle de qualité et les tests sur les isolats de patients concernés par le contrôle de qualité non satisfaisant. Si le contrôle qualité ne donne toujours pas les résultats prévus, ne rendez pas les résultats des patients. N'utilisez pas le produit tant que vous n'avez pas contacté le Service Technique.

1. Ajoutez 1,0 ml de VersaTREK Myco GS dans les flacons de culture VersaTREK Myco.
2. Réhydratez le pyrazinamide lyophilisé avec du PZA Rehydration Buffer acide comme indiqué dans « Inoculation de flacons de culture VersaTREK Myco pour test de sensibilité (point 4) ».
3. Ajoutez 1 ml de médicament à chaque flacon de VersaTREK Myco pour atteindre une concentration finale en pyrazinamide de 300 µg/ml. Ajouter 1,0 ml de PZA Rehydration Buffer au flacon de contrôle.
4. Ajoutez 0,5 ml d'une dilution à 1:10 de culture provenant d'un cas positif d'un flacon d'ensemencement VersaTREK Myco aux flacons de culture appropriés contenant le médicament et au flacon de contrôle exempt de médicament.
5. Après observation des résultats attendus, utilisez le reste du lot pour tester des échantillons. Si les résultats attendus ne sont pas observés, contactez le Support Technique VersaTREK.

TABLEAU 3 Résultats du Contrôle de Qualité attendus

Organisme	ATCC	Pyrazinamide
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensible

La cause la plus courante d'échec du Contrôle de qualité est une sur-inoculation des tests PZA et la contamination. Si vous obtenez de manière répétée des résultats de résistance faux, l'antibiotique PZA a très probablement perdu de son activité. Il est alors recommandé de faire le test avec un antibiotique provenant d'un autre lot.

LIMITATIONS

1. Le test de sensibilité VersaTREK Myco PZA ne permet pas de donner le degré de sensibilité de l'isolat testé. Il s'agit d'un test qualitatif.
2. Le test de sensibilité VersaTREK Myco PZA ne peut être effectué que sur les instruments VTI ou ESP. Le test ne peut être effectué manuellement.
3. Utilisez uniquement des cultures pures de *M. tuberculosis*. L'utilisateur doit confirmer la pureté de la culture, en particulier si le résultat indique une résistance. Des cultures contenant plusieurs espèces de Mycobacteria peuvent donner des résultats erronés.
4. La préparation des isolats d'une façon non conforme aux recommandations du fabricant peut conduire à des résultats erronés.

5. La réhydratation du PZA avec un volume non approprié de PZA Rehydration Buffer acide peut conduire à des résultats erronés.
6. Il est important de mélanger soigneusement les flacons inoculés . Un mélange réalisé de façon inadéquate peut conduire à des résultats erronés.
7. La non utilisation du supplément de croissance VersaTREK Myco GS peut conduire à des résultats erronés.

RESULTATS ATTENDUS

Lors du test initial, un total de 96 isolats cliniques de *M. tuberculosis* a été testé avec le VersaTREK Myco PZA Kit sur cinq lieux géographiques différents. Des isolats cliniques frais et des repiquages d'isolat à partir de milieux liquides et solides ont été utilisés lors du test.

La répétabilité a été <10 % pour cette étude. Le délai moyen d'obtention du résultat pour le test de sensibilité VersaTREK Myco PZA a été de 8,18 jours pour un inoculum liquide ensemencé, ce délai variant de 3 à 15 jours. Voir figure 1 ci-dessous.

CARACTÉRISTIQUES D'EXECUTION

Test en interne :

Reproductibilité du lot :

La reproductibilité du lot a été étudiée à l'aide de 4 souches bien caractérisées de *M. tuberculosis* qui ont été testées trois fois au cours de trois journées différentes. Trois lots de bouillon VersaTREK Myco ont été représentés dans l'essai. La reproductibilité globale a été de 100 % pour l'inoculum ensemencé.

La reproductibilité de huit lots de VersaTREK Myco PZA, sept bouillons VersaTREK Myco et six VersaTREK Myco GS a été évaluée avec des résultats acceptables pour tous les lots.

Panel de test du CDC (CDC Challenge Panel) :

Dix souches bien caractérisées de *M. tuberculosis* ont été testées et comparées au BACTEC 460TB et aux résultats attendus. Huit souches étaient sensibles au PZA et deux étaient résistantes. La concordance globale avec BACTEC et les résultats attendus a été de 100 %.

Comparaison de ESP Culture System II et de VersaTREK Microbial Detection System :

Le récupération de divers organismes et le délai de détection ont été utilisés pour montrer l'absence de différence entre les performances de ESP Culture System II et VersaTREK Microbial Detection System avec le test supplémentaire de *M. tuberculosis* et PZA. Les résultats et délais de détection de ces deux systèmes n'ont pas montré de différence significative.

Test sur des sites cliniques :

Évaluation clinique :

Le test de sensibilité VersaTREK Myco PZA a été évalué sur cinq lieux géographiques différents, sur des sites régionaux de référence, des laboratoires de santé publique et des laboratoires hospitalo-universitaires. Le VersaTREK Myco PZA Kit a été comparé au test de sensibilité BACTEC 460TB PZA.

Test de reproductibilité :

La reproductibilité du lot a été étudiée sur deux souches bien caractérisées de *M. tuberculosis* du CDC en utilisant à chaque fois deux lots de bouillons VersaTREK Myco et VersaTREK Myco GS. Le test a été effectué trois fois au cours de trois journées différentes. La reproductibilité globale a été ≥ 95 % pour l'inoculum ensemencé.

Panel de test :

Le panel de test du CDC (CDC challenge test) de 30 organismes a été testé sur 3 sites. Sur les 90 points tests de mesure possibles, seuls 77 ont été valides. Le nombre inférieur de tests (répétabilité de 7,2 %) était dû à une absence de croissance, une contamination ou un problème de l'instrument. Parmi les 77 organismes testés, 68 étaient sensibles et 9 étaient résistants. Une concordance globale de 98,7 % par rapport aux résultats attendus a été observée.

Test d'isolat clinique en utilisant des inoculum ensemencés

Les tests de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* ont été effectués sur 96 isolats provenant d'inoculum liquide.

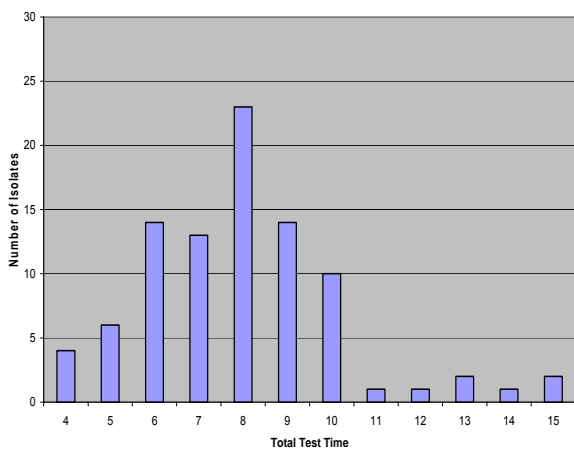
Les résultats des tests des isolats cliniques pour le PZA à 300 $\mu\text{g/ml}$ avec l'ESP et à 100 $\mu\text{g/ml}$ avec BACTEC sont présentés dans le Tableau 4. Le test a mis en évidence 11 résultats discordants pour l'inoculum ensemencé. Parmi les 11 résultats discordants, 10 étaient résistants pour ESP/VTI et sensibles pour BACTEC et un était sensible pour ESP/VTI et résistant pour BACTEC.

Tableau 4. Résultats des isolats cliniques - Test de sensibilité VersaTREK Myco PZA comparé à la sensibilité de BACTEC 460TB.

		Système BACTEC 460TB		Système ESP/VTI			
		Résultats attendus		Sensible		Résistant	
Source	Nb. de tests	S	R	Nb. d'accord	Accord de catégorie % (IC à 95 %) ^a	Nb. d'accord	Accord de catégorie % (IC à 95 %)
Liquide	96	83	13	73	88 (79-94,1)	12	92,3 (64-99,8)

a. Intervalles de confiance à 95% (CI). Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figure 1. Durée totale du test pour la préparation d'un inoculum ensemençé pour le test de sensibilité VersaTREK Myco PZA de *Mycobacterium tuberculosis*



INFORMATIONS SUR LES DANGERS

Pyrazinamide

- Xn Nocif
- R22 Nocif en cas d'ingestion.
- S20 Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation.
- S36 Porter un vêtement de protection approprié.
- S46 En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

RÉFÉRENCES: Page 8

Pour obtenir de plus amples informations, veuillez appeler l'assistance technique de TREK au 1-216-351-8735.

Português

VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Kit VersaTREK Myco PZA é um teste rápido qualitativo de sensibilidade *in vitro* à pirazinamida (PZA) para cultura de *Mycobacterium tuberculosis*, (,). O Kit VersaTREK Myco PZA é utilizado com o VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) e o ESP® Culture System II (ESP).

São preparadas suspensões apropriadas de inóculo, a partir de uma garrafa para processamento VersaTREK Myco líquido.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O diagnóstico rápido da tuberculose é importante para dar início a uma terapia medicamentosa apropriada e para o estabelecimento de medidas de prevenção da disseminação desta doença altamente contagiosa. O tratamento retardado, em particular da estirpe resistente a múltiplos antibióticos do *M. tuberculosis* (MDR-TB), pode resultar numa falha do tratamento e na morte do doente.¹ De forma a obviar estas questões, os microbiologistas clínicos deverão utilizar os testes de diagnóstico mais rápidos e sensíveis que forneçam resultados fiáveis. Os peritos dos Centros de Controlo de Doença (CDC) efectuaram várias recomendações no que diz respeito ao teste micobacteriano, incluindo a utilização de meios líquidos e sólidos para cultura micobacteriana.²

Para o teste de sensibilidade à pirazinamida do *M. tuberculosis*, o Sistema VTI/ESP combina um meio de cultura líquido (caldo VersaTREK Myco), um suplemento de crescimento (VersaTREK Myco GS) e concentrações específicas de pirazinamida, com um sistema de detecção que automaticamente incuba e continuamente monitoriza as garrafas de cultura inoculadas com isolados de *M. tuberculosis* de amostras de diferentes origens. Os tampões nas garrafas VersaTREK Myco fornecem uma matriz de suporte de crescimento e aumento da área de superfície exposta ao oxigénio do espaço livre. A tecnologia do Sistema VTI/ESP é baseada na detecção das alterações de pressão do espaço livre numa garrafa selada, devido a crescimento microbiológico. Foi desenvolvido um algoritmo especial para detecção de micobactérias de crescimento lento.

Com o Sistema VTI/ESP, o antibiótico anti-tuberculose PZA pode ser injectado nas garrafas VersaTREK Myco suplementadas com VersaTREK Myco GS. Um inóculo de uma cultura confirmada de *M. tuberculosis* proveniente de uma garrafa para processamento é adicionado a uma garrafa de controlo isento de antibiótico, utilizado como controlo positivo e a uma garrafa de teste que contenha PZA. Se o microrganismo for sensível ao antibiótico, não será detectado crescimento microbiológico ou será detectado crescimento retardado. Se o microrganismo for resistente à PZA, o crescimento microbiológico será detectado pelo aparecimento de uma curva que irá apresentar uma curva descendente relativamente à linha de base. O tempo de detecção da garrafa isenta de antibiótico determina quando um teste está concluído. O antibiótico utilizado neste sistema é a pirazinamida, hidratada com um tampão de re-hidratação ácido a uma concentração crítica específica. O objectivo do tampão de re-hidratação ácido é obter um pH final de 5,9 a 6,0, que otimiza a actividade do antibiótico PZA. A concentração de antibiótico específica para este teste é de 300 µg/ml.

A detecção de crescimento microbiológico no Sistema VTI/ESP baseia-se na medição sensível da produção de gás e/ou consumo de gás dentro do espaço livre de um frasco de cultura selado. Esta informação é utilizada para criar uma curva de pressão para cada garrafa. Um algoritmo interno analisa a informação, de forma a determinar o estado de cada amostra de teste. Quando é definido um conjunto de condições, uma garrafa é assinalada positiva. Existem aproximadamente 10⁶CFU/ml de micobactérias na altura da detecção.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste de sensibilidade de amostras de *M. tuberculosis* é efectuado com o Sistema VTI/ESP, através da inoculação de uma suspensão de microrganismos nas garrafas de caldo VersaTREK Myco, suplementados com VersaTREK Myco GS e pirazinamida. Um VersaTREK Connector é fixado a cada garrafa, de forma a estabelecer um sistema fechado para monitorização da garrafa com o aparelho VTI/ESP. Uma membrana hidrofóbica no VersaTREK Connector evita a produção de aerossóis.

A informação de isolados é introduzida no computador do sistema e as garrafas são colocadas no aparelho, para incubação a 35 – 37 °C, em condições estáveis. O Sistema VTI/ESP detecta o crescimento Micobacteriano, monitorizando continuamente (a cada 24 minutos) a taxa de consumo de oxigénio no espaço livre da garrafa de cultura e reportando essa resposta de crescimento com um sinal positivo. No final do período de incubação especificado, tal como determinado pela garrafa de controlo isento de antibiótico de cada isolado testado, o isolado é manualmente determinado como sensível ou resistente ao antibiótico.

REAGENTES

O Kit VersaTREK Myco PZA contém duas garrafas de antibiótico pirazinamida liofilizada e quatro garrafas de Tampão de Re-hidratação ácido de PZA. Cada garrafa de medicamento deve ser re-hidratado com 25 ml de tampão de re-hidratação ácido.

FÓRMULA NA RE-HIDRATAÇÃO*

(PRB) Tampão de Re-hidratação	Ácido de PZA	25 ml
(PZA) Pirazinamida		0,45% peso/volume
(SA) Agente de Solubilização		1,25% peso/volume

*Ajustada para corresponder aos critérios de comportamento funcional

PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
2. Consulte as Fichas de Segurança do Material para uma informação completa sobre os riscos.
3. AVISO! AMOSTRA DE TESTE POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Siga as Precauções Universais e a política institucional de manipulação e eliminação de agentes infecciosos.
4. No trabalho com culturas de *Mycobacterium tuberculosis*, recomendam-se as práticas, equipamento de contenção e instalações de Nível 3 de Biosegurança.³
5. O VersaTREK Connector contém uma agulha afiada encastrada e esterilizada aquando da remoção do selo, mas potencialmente contaminada no final da sua utilização.
Siga a política institucional para manipulação e eliminação de agentes infecciosos. (Não manipular de forma inadvertida. Esterilizar antes de eliminar. Eliminar num contentor aprovado para objectos contundentes. Não reutilizar.)
6. Inspeccione visualmente todas as garrafas no que respeita a contaminação, fissuras ou outros sinais de deterioração. Não utilize garrafas que se apresentem turvas ou com fissuras.
7. Utilize apenas seringas com bloqueio de agulha.
8. Proceda à autoclavagem de todas as garrafas VersaTREK Myco antes da eliminação.
9. Re-hidrate as garrafas de antibiótico PZA liofilizada apenas com o Tampão de Re-hidratação ácido de PZA fornecido no kit.

ARMAZENAMENTO

VersaTREK Myco PZA: Conservar entre 2° a 8° C. Proteger da exposição solar. Na re-hidratação, conservar entre 2° e 8° C e utilizar dentro de 4 semanas ou congelar a -20° C e utilizar dentro de 3 meses. Depois de descongelado, não voltar a congelar.

PROCEDIMENTO: TESTE DE SENSIBILIDADE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZANDO O VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

Materiais Fornecidos:

Garrafas de Cultura VersaTREK Myco	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
Kit VersaTREK Myco PZA	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiais Necessários mas Não Fornecidos:

Água esterilizada destilada ou desionizada
Autoclave
Middlebrook 7H10 ou outro meio micobacteriano com base de agar e ovo, para verificações da pureza
Incubador CO₂, 37°C
Placas de Petri esterilizadas
Seringas de tuberculina esterilizadas com agulhas fixas permanentes
Desinfetante micobactericida (p. ex., Amphyl™, OMNI™, etc.)
Tampões de álcool
Misturador vórtex
Microscópio
Câmara de fluxo laminar
Materiais para lâminas de coloração
Microrganismo de Controlo de Qualidade: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco para Teste de Sensibilidade Myco

1. Identifique com uma etiqueta cada garrafa de cultura VersaTREK Myco com a informação de identificação. Para o teste de PZA, serão utilizadas 2 garrafas por teste.

- Desinfecte as tampas das garrafas de cultura com álcool.
- Adicione de forma asséptica 1,0 ml de VersaTREK Myco GS, a cada garrafa de cultura, injectando através do septo com uma agulha e seringa.
- Re-hidrate PZA liofilizada adicionando assepticamente 25 ml de Tampão de Re-hidratação ácido de PZA a cada garrafa de antibiótico. O que resultará numa concentração de antibiótico de 4500 µg/ml.
- Adicione de forma asséptica 1,0 ml de antibiótico a cada garrafa de cultura, injectando através do septo com uma agulha e seringa. A concentração final de pirazinamida é de 300 µg/ml. Para a garrafa de controlo isento de antibiótico, adicione 1 ml de Tampão de Re-hidratação ácido de PZA em vez do antibiótico. Podem ser efectuados vinte e cinco testes de uma só garrafa.

Antibiótico	Concentração de um antibiótico após Reconstituição	Volume adicionado a garrafas de teste Myco	Concentração Final nas garrafas de Teste
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300 µg/ml

- O inóculo de uma amostra para teste de sensibilidade deve ser confirmado como cultura pura de *M. tuberculosis* antes do teste de PZA e preparado como segue:

Garrafa para Processamento VersaTREK Myco - Um volume de 0,5 ml de um equivalente a McFarland 1.0 criado a partir de um meio sólido ou líquido (cultivado em Middlebrook 7H9 ou líquido de uma garrafa de detecção principal) é assepticamente injectado numa garrafa de cultura VersaTREK Myco suplementado com 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. Um VersaTREK Connector esterilizado é colocado na garrafa e este é incubado no aparelho, até ser determinado um sinal positivo. Esta garrafa para Processamento deve ser utilizada dentro de 72 horas. Remova o VersaTREK Connector e leve ao vórtex durante 1 a 2 minutos. Adicione 0,5 ml de uma diluição de 1:10 de cultura da garrafa para Processamento VersaTREK Myco positivo às garrafas de cultura apropriadas que contenham o antibiótico e à garrafa de controlo de crescimento isento de antibióticos.

- Limpe as garrafas de cultura e as tampas com um desinfectante Micobactericida.
- Homogeneize todas as garrafas invertendo várias vezes.
- Remova o selo do fundo de um VersaTREK Connector. Prima a extremidade da agulha do VersaTREK Connector através da tampa da garrafa de cultura. NOTA: Não inverta a garrafa de cultura enquanto o conector está na garrafa. O fluido na agulha pode interferir com as leituras de pressão da garrafa.
- Coloque a garrafa de cultura com o VersaTREK Connector no aparelho. Consulte o Manual do Utilizador do Sistema VTI/ESP para detalhes sobre a introdução de garrafas.

Sugestão de carregamento: Se o número de acesso da amostra for “123”, atribua números de acesso a garrafas de teste de PZA como 123PC, para controlo positivo e 123P, para pirazinamida. Desta forma, todas as garrafas associadas a este número de acesso de amostra poderão ser pesquisadas e localizadas como um grupo.

RESULTADOS

Para o teste de sensibilidade utilizando o Sistema VTI/ESP, um isolado de teste é interpretado como sensível ou resistente a um antibiótico com base numa fórmula. Registe o tempo de detecção da garrafa isenta de antibiótico. Este dado é utilizado para calcular as interpretações de sensibilidade ou resistência utilizando a seguinte fórmula:

Sensível: Sem crescimento ou o tempo de detecção da garrafa de antibiótico é superior a três dias (arredondado para o número inteiro mais próximo) do tempo de detecção da garrafa de controlo isento de antibiótico (arredondado para o número inteiro mais próximo). Arredondar ao número inteiro mais aproximado, se tempo $\leq XX.49$ é arredondamento por defeito e se tempo $\geq XX.50$ é arredondamento por excesso.

Resistente: O tempo de detecção de garrafa de medicamento é igual a \pm três dias (arredondado para o número inteiro mais aproximado) do tempo de detecção de garrafa de controlo isento de medicamentos (arredondado para o número inteiro mais aproximado). Arredondar ao número inteiro mais aproximado, se tempo $\leq XX.49$ é arredondamento por defeito e se tempo $\geq XX.50$ é arredondamento por excesso.

NOTA:

- Nenhuma garrafa deve ser assinalado positivamente antes do terceiro dia. As garrafas assinalados antes de decorridos três dias estarão contaminados ou o inóculo é demasiado elevado. O ensaio deve ser repetido.
- Uma garrafa de ensaio pode dar sinal antes de garrafa de controlo (consultar a tabela 2, exemplo D).

Todos os resultados resistentes devem ser confirmados por um método alternativo antes do relatório.

As garrafas que dão sinal positivo devem ser coradas com corantes bacilos ácido-álcool resistentes para micobactérias (AFB) e subcultivadas numa placa de agar Middlebrook 7H10 ou 7H11, bem como numa placa de gelose não selectiva (p. ex. Agar Sangue) certificando-se da pureza da amostra. As garrafas de controlo de crescimento que dêem sinal em menos de 2,5 dias podem indicar a presença de contaminante não micobacteriano, enquanto que as garrafas de controlo que não dêem sinal dentro de 12 dias após terem sido inoculados podem ser indicativos de preparação de garrafa indevida. Em qualquer situação, a amostra deve ser novamente testada.

A mono-resistência ao PZA não é comum, por isso, na eventualidade de resultados de resistência não esperados, verifique a pureza e identificação do isolado.

Reveja **SEMPRE** o gráfico do isolado antes do relatório. Consulte o Manual do Utilizador para análise de gráficos. Se os gráficos para testes que tiverem dado sinal positivo não parecem normais, contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1-216-351-8735.

Relatório do Resultado de PZA:

TABELA 1: Observações de Teste e Avaliação de Teste

Garrafa de Teste	Resultado obtido	Causa possível	Acção
Controlo de crescimento	<3 dias da inoculação	Contaminante possível ou inóculo demasiado denso; verificar placas e gráficos de pureza.	REPETIR TESTE
Controlo de crescimento*	>11 dias da inoculação	Microorganismo não viável, inóculo demasiado leve	REPETIR TESTE
Controlo de crescimento	Crescimento detectado entre 3 e 11 dias após inoculação		Teste válido - avaliar garrafas de antibiótico
Verificação de pureza	Não se observou contaminantes durante pelo menos 18 horas na placa Agar Sangue		Teste válido
	Organismos não AFB observados	Cultura não era pura	REPETIR TESTE
	Varição de colónia não observada em placas agar Middlebrook		Teste válido - Sem acção
	Varição de colónia observada em placas agar Middlebrook	Mais de uma espécie de micobactéria está presente	REPETIR TESTE para verificar resultados; notificar médico que os resultados finais estão pendentes

*O limite superior de 11 dias de tempo de detecção para o controlo de crescimento foi estabelecido por dados internos e clínicos.

Assegure-se de que verifica os resultados da subcultura no meio sólido para agar micobacterias, para se certificar que apenas uma espécie de micobactéria esteve presente, especialmente no caso de um resultado resistente.

TABELA 2: Exemplos de Resultados

Paciente	A	B	C	D	E	F	G
Controlo PZA positivo (dias)	2	4	5	9	10	12	13
Medicamento PZA positivo (dias)	5	2	6	7	14	Sem Crescimento	14
Resultado	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio	Inválido, repetir ensaio	Resistente	Resistente	Susceptível	Susceptível	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio

*Todos os resultados resistentes devem ser confirmados por um método alternativo antes do relatório.

CONTROLO DE QUALIDADE

Um novo número de lote ou carregamento de VersaTREK Myco PZA deve ser testado com o microrganismo de controlo de qualidade *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensível a PZA). Os resultados esperados são apresentados na Tabela 3. O controlo de qualidade deve ser efectuado semanalmente quando o teste de sensibilidade for efectuado. A observação dos resultados esperados, dentro de 4 a 15 dias, indica que os reagentes estão prontos para utilização no teste de isolados do doente.

Se não forem observados os resultados esperados, não reporte os resultados do doente. Repita o controlo de qualidade e quaisquer isolados de doente afectados pela falha de controlo de qualidade inicial. Se a repetição de controlo de qualidade não correr conforme esperado, não reporte os resultados do doente. Não utilize o produto até ter contactado os Serviços Técnicos.

1. Adicione 1 ml de VersaTREK Myco GS aos frascos de cultura VersaTREK Myco.
2. Re-hidrate pirazinamida liofilizada com Tampão de Re-hidratação ácido de PZA, tal como descrito em “Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco para Teste de Sensibilidade (Item 4).”
3. Adicione 1 ml de antibiótico a cada garrafa VersaTREK Myco para obter concentrações final de pirazinamida a 300 µg/ml. Adicione 1,0 ml de Tampão de Re-hidratação de PZA à garrafa de controlo de crescimento.
4. Adicione 0,5 ml de uma diluição de 1:10 de cultura de uma garrafa para Processamento VersaTREK Myco positiva às garrafas de cultura apropriadas que contenham o antibiótico e ao frasco de controlo de crescimento isento de antibiótico.
5. Após observação dos resultados esperados, utilize o restante lote no teste de amostras. Se não forem alcançados os resultados esperados, contacte o Apoio Técnico da VersaTREK.

TABELA 3 Resultados de Controlo de Qualidade Esperados

Organismo	ATCC	Pirazinamida
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensível

As causas mais comuns de falha de controlo de qualidade são o excesso de inóculo dos conjuntos de teste de PZA e a contaminação. Se forem obtidos resultados repetidos de falsa resistência, o antibiótico PZA deverá ter perdido a sua actividade. Recomenda-se o teste com um novo stock de antibióticos.

LIMITAÇÕES

1. O teste de sensibilidade VersaTREK Myco PZA não interpreta o grau de sensibilidade do isolado a testar. É um teste qualitativo.
2. O teste de sensibilidade VersaTREK Myco PZA apenas pode ser efectuado em aparelhos VTI ou ESP. O teste não pode ser efectuado manualmente.
3. Utilize apenas culturas puras de *M. tuberculosis*. O utilizador deve confirmar a pureza da cultura, especialmente se o resultado for resistente. As culturas que contiverem múltiplas espécies de Micobactérias podem fornecer resultados errados.
4. A não preparação dos isolados, de acordo com as recomendações do fabricante, pode levar a resultados imprecisos.
5. A não re-hidratação de PZA com o devido volume de Tampão de Re-hidratação ácido de PZA pode fornecer resultados imprecisos.
6. A mistura homogénea de garrafas inoculadas é importante. A falta de homogeneização adequada pode levar a falsas resistências.
7. A não utilização do suplemento de crescimento VersaTREK Myco GS pode levar a falsas sensibilidades.

RESULTADOS ESPERADOS

No teste inicial, um total de 96 isolados clínicos de *M. tuberculosis* foi testado com o Kit VersaTREK Myco PZA em cinco locais geograficamente diversos. O teste incluiu tanto isolados clínicos recentes, como sub-cultivados de meio líquido e sólido.

As taxas de repetição deste estudo foram de <10%. O tempo médio do resultado do teste de sensibilidade do VersaTREK Myco PZA foi de 8 a 18 dias para um inóculo de processamento líquido, num limite de 3 a 15 dias. Consulte a figura 1 abaixo.

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMENTO FUNCIONAL

Teste interno

Reprodutibilidade do lote:

A reprodutibilidade do lote foi efectuada utilizando 4 estirpes bem caracterizadas de *M. tuberculosis*, testadas em triplicado e em três dias separados. Três lotes de caldo VersaTREK Myco foram representados no teste. A reprodutibilidade geral foi de 100% para inóculo de processamento.

Foram avaliados quanto à reprodutibilidade oito lotes de VersaTREK Myco PZA produzido, sete de caldo VersaTREK Myco e seis de VersaTREK Myco GS, com resultados aceitáveis para todos os lotes.

Teste de Painel Padronizado CDC:

Dez estirpes bem caracterizadas de *M. tuberculosis* foram testadas e comparadas com BACTEC 460TB e com os resultados esperados. Oito estirpes foram sensíveis e duas foram resistentes a PZA. Houve um acordo global de 100% com BACTEC e os resultados esperados.

Comparação entre o ESP Culture System II e o VersaTREK Microbial Detection System:

A recuperação de diferentes microrganismos e o tempo de detecção foram utilizados para demonstrar a ausência de diferença no comportamento funcional entre o ESP Culture System II e o VersaTREK Microbial Detection System, com teste adicional de *M. tuberculosis* e PZA. Os resultados e tempo de detecção por ambos os sistemas não foi significativamente diferente.

Testes Laboratoriais:

Avaliação Clínica:

O teste de sensibilidade VersaTREK Myco PZA foi avaliado em cinco locais geograficamente diversos, compostos por centros de referência regional, laboratórios de saúde pública e laboratórios com base em hospitais universitários. O Kit VersaTREK Myco PZA foi comparado com o método de teste de sensibilidade BACTEC 460TB PZA.

Análise de Reprodutibilidade:

A reprodutibilidade de lote foi efectuada utilizando duas estirpes bem caracterizadas de *M. tuberculosis* de CDC, utilizando cada uma dois lotes de caldo VersaTREK Myco e VersaTREK Myco GS. O teste foi efectuada em triplicado e em três dias separados. A reprodutibilidade global foi de $\geq 95\%$ para inóculo processado.

Análise de Repetibilidade:

O conjunto padronizado CDC de 30 microrganismos foi testado em três locais. Dos 90 pontos de teste possíveis, apenas 77 foram válidos. O reduzido número de testes (taxa de repetição de 7,2%) deveu-se a não crescimento, contaminação ou questões do aparelho. Dos 77 microrganismos testados, 68 foram sensíveis e 9 foram resistentes. Houve um acordo global de 98,7% com os resultados esperados.

Teste de Isolado Clínico utilizando Inóculo de processamento

Os testes de sensibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* foram efectuados em 96 isolados de uma fonte de inóculo líquido.

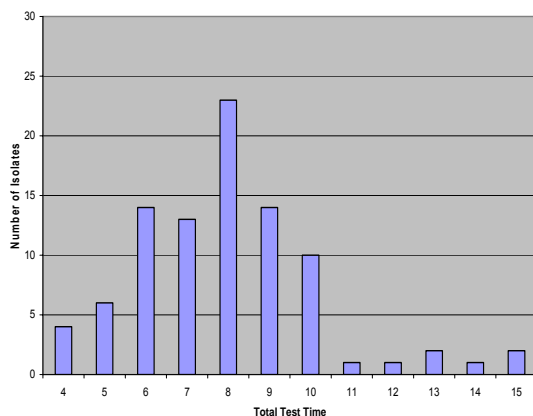
A Tabela 4 apresenta os resultados de teste de isolado clínico para PZA a 300 $\mu\text{g/ml}$ para ESP e 100 $\mu\text{g/ml}$ para BACTEC. O teste apresentou 11 resultados discordantes para inóculo processado. Dos 11 resultados discordantes de inóculo processado, 10 foram resistentes a ESP/VTI e sensíveis no BACTEC; e um foi sensível a ESP/VTI e resistente no BACTEC.

Tabela 4. Resultados de Isolado Clínico - Teste de sensibilidade VersaTREK Myco PZA comparado com sensibilidade BACTEC 460TB.

Fonte	N.º de Testes	Sistema BACTEC 460TB		Sistema ESP/VTI			
		Resultados Esperados		Sensibilidade		Resistente	
		S	R	N.º de Acordo	% de Acordo na Categoria (95% CI) ^a	N.º de Acordo	% de Acordo na Categoria (95% CI)
Líquido	96	83	13	73	88 (79-94.1)	12	92.3 (64-99.8)

a. 95% de Intervalos de Confiança (CI). Lee, Eric W. e Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figura 1. Tempo de teste total para preparação de inóculo processado para teste de sensibilidade VersaTREK Myco PZA de *Mycobacterium tuberculosis*



INFORMAÇÃO DE RISCO







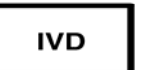

Pirazinamida

Xn	Nocivo
R22	Nocivo por ingestão.
S20	Não comer nem beber durante a utilização.
S36	Usar vestuário de protecção adequado.
S46	Em caso de ingestão, consultar imediatamente o médico e mostrar-lhe a embalagem e o rótulo.

REFERÊNCIAS: Página 8

Para informações adicionais contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1-216-351-8735.

Symbols / Símbolos/ Simboli / Symboles/ Símbolos

	GB ES IT FR PT	Batch code Código de lote Codice del lotto Code du lot Código do grupo
	GB ES IT FR PT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo Référence du catalogue Número de catálogo
	GB ES IT FR PT	Manufacturer Fabricante Fabbricante Fabricant Fabricante
	GB ES IT FR PT	Consult instructions for use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Consulter les instructions d'utilisation Consulte instruções para o uso
	GB ES IT FR PT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura Limites de température Limitação de temperatura
	GB ES IT FR PT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro Date de péremption Uso perto YYYYMMDD/YYYYMM (MM=end of month) aaaammd/aaaamm (mm=fin del mes) AAAAMMGG/AAAAMM (MM=fine mese) AAAAMMJJ/AAAAMM (MM=fin de mois) YYYYMMDD/YYYYMM (MM= fim do mês)
	GB ES IT FR PT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Dispositivo Médico Diagnóstico
	GB ES IT FR PT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per <n> saggi Contenu suffisant pour <n> tests Contem suficiente para <n> testes

<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">EC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">REP</div> </div>	GB ES IT FR PT	Authorized Representative in the European Community Representante autorizado en la Comunidad Europea Mandatario nella Comunità Europea Mandataire dans la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Europeia
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONT</div>	GB ES IT FR PT	Contains Contiene Contiene Contient Contém
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">USE Mtb S</div>	GB ES IT FR PT	For use with the VersaTREK and ESP II systems to perform <i>M.tuberculosis</i> susceptibility testing. Para su uso con los sistemas VersaTREK y ESP II en la realización de pruebas de sensibilidad de <i>M.tuberculosis</i> . Da utilizzare con i sistemi VersaTREK e ESP II per eseguire il test di sensibilità di <i>M.tuberculosis</i> . À utiliser avec les systèmes VersaTREK et ESP II pour effectuer les essais de sensibilité de <i>M.tuberculosis</i> Para utilização com os sistemas VersaTREK e ESP II para realização do teste de sensibilidade de <i>M.tuberculosis</i>
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">(PZA)</div>	GB ES IT FR PT	Acidic PZA Rehydration Buffer Sólución amortiguadora rehidratante ácida PZA Tampone acido di reidratazione della PZA Tampon acide de réhydratation PZA Tampão de Re-hidratação Ácido de PZA
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">(PRB)</div>	GB ES IT FR PT	Pyrazinamide Pirazinamida Pirazinamide Pyrazinamide Pirazinamida