

INDEX, ÍNDICE, INDICE, INDEX, ÍNDICE	
2 – 8	English
9 – 15	Español
16 – 22	Italiano
23 – 29	Français
30 – 36	Português
37– 38	Symbols Símbolos Simboli Symboles Símbolos

English

VersaTREK® MYCO SUSCEPTIBILITY KIT, 7115-60

INTENDED USE

The VersaTREK Myco Susceptibility Kit is intended for qualitative *in vitro* susceptibility testing of isolated colonies of *Mycobacterium tuberculosis* with rifampin, ethambutol, and isoniazid on either the VersaTREK Instrument or the ESP Culture System II. Appropriate inoculum sources are prepared from growth on solid agar, such as Middlebrook 7H10 or Lowenstein-Jensen slants, or Middlebrook 7H9 broth.

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, in particular 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 rapid and sensitive diagnostic tests that provide reliable results. Experts at the Centers for Disease Control (CDC) have made several recommendations regarding mycobacterial testing, including the use of both a liquid and solid medium for mycobacterial culture.²

For susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, the VersaTREK/ESP Culture System II combines a liquid culture medium (VersaTREK Myco Broth), a growth supplement (VersaTREK Myco GS), and specific antibiotics with a detection system that automatically incubates and continuously monitors culture bottles inoculated with isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from various 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 VersaTREK/ESP Culture System II 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 VersaTREK/ESP Culture System II, anti-tuberculosis drugs can be injected into VersaTREK Myco bottles supplemented with VersaTREK Myco GS and specific *Mycobacterium tuberculosis* isolates. An inoculum of *Mycobacterium tuberculosis*, prepared from colonies grown on solid media or from a seed bottle, is added to a drug-free control bottle, used as a positive control, and the bottles containing the specific concentrations of drug. The presence of growth is determined automatically by the instrument, but the actual determination of susceptibility or resistance is performed by a manual comparison of the drug-free positive control bottle and the drug-containing bottles. If the organism is susceptible to a drug, either no microbial growth or delayed growth will be detected. If the organism is resistant to a drug, microbial growth will be detected within a specified time and is graphically observed on the instrument by the generation of a downward consumption curve. The drugs used in this system are the primary drugs rifampin, isoniazid, and ethambutol at specific concentrations. These drugs are provided in a lyophilized form.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* specimens are performed with the VersaTREK/ESP Culture System II by inoculating a suspension of organisms into VersaTREK Myco bottles that have been supplemented with VersaTREK Myco GS and with one of the three primary drugs. A VersaTREK Connector is attached to each bottle to establish a closed system for monitoring the bottle with the VersaTREK/ESP instrument. A hydrophobic membrane in the VersaTREK Connector prevents aerosolization. Clinical information is entered into the system computer and the bottles are placed in the instrument for incubation at 35 – 37 °C under stationary conditions. VersaTREK/ESP Culture System II detects mycobacterial growth by automatically 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 a drug.

REAGENTS

The VersaTREK Myco Susceptibility Kit contains two bottles each of rifampin and isoniazid and three bottles of ethambutol in lyophilized form. Each bottle is to be rehydrated with 25 ml of sterile distilled or deionized water.

FORMULA UPON REHYDRATION*

(H2O)	Processed Water	25 ml
(RIF)	Rifampin	0.003% w/v
(SA)	Solubilizing Agent	1.25 % w/v
(H2O)	Processed Water	25 ml
(INH)	Isoniazid	0.0012% w/v
(SA)	Solubilizing Agent	1.25% w/v
(H2O)	Processed Water	25 ml
(EMB)	Ethambutol	0.024% 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. Working with *Mycobacterium tuberculosis* grown in culture, the recommendation is for Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.^{3, 4, 5}
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 blood-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, if using this inoculation method.
NOTE: Inoculation may be performed by opening the bottles and adding the sample using sterile pipettes.
8. Autoclave all VersaTREK Myco bottles prior to disposal.

STORAGE

VersaTREK Myco Susceptibility Kit: 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 Susceptibility Kit	7115-60
VersaTREK Connectors	7150-44

Materials Required but Not Provided:

Sterile distilled or deionized water
Middlebrook 7H10 or other mycobacterial agar or egg-base medium
Autoclave
CO₂ incubator, 37°C
Sterile loops
Sterile tuberculin syringes with permanently attached needles
Sterile Pipettes or Pipettor with Sterile Pipette Tips (optional)
Mycobactericidal disinfectant (e.g. AmphyI™, OMNI™, etc.)
Alcohol swabs
Vortex mixer
Biological safety cabinet
Microscope
Materials for staining slides
Quality Control organisms: *M. tuberculosis* ATCC® 25618, *M. tuberculosis* ATCC 35838, *M. tuberculosis* ATCC 35822, and *M. tuberculosis* ATCC 35837

Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Myco Susceptibility Testing

1. Rehydrate the lyophilized drugs by aseptically adding 25 ml sterile distilled or deionized water to each drug vial. Additional drug concentrations should be made for the isoniazid and ethambutol vials as instructed in Table 1.

Table 1: Anti-Tuberculosis Drug Preparation

Drug and Final Concentration in Myco Bottles	Amount of Diluent Added to Lyophilized Bottles	Concentration after Rehydration	Additional Dilutions	Concentration to be Injected into Test Bottles	Number of Tests/Vial	Number of Tests/Kit
Rifampin 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ml	No	30 µg/ml	50	100
Isoniazid 0.4 µg/ml Isoniazid 0.1 µg/ml	25 ml	12µg/ml	No 5 ml diluted drug plus 15 ml water	12 µg/ml 3 µg/ml	40 40	80 80
Ethambutol 8 µg/ml Ethambutol 5 µg/ml	25 ml	240µg/ml	No 10 ml diluted drug plus 6 ml water	240 µg/ml 150 µg/ml	30 32	90 96

NOTE: There is sufficient volume to perform 80 tests per kit. The above dilutions provide an excess of some of the drugs in some concentrations. Discard excess amounts and do not mix components of this kit with different lot numbers of other kits.

2. The inoculum of a specimen for susceptibility testing can originate from two sources. Prior to setting up a susceptibility test on any isolate, a determination should be made that the isolate is *Mycobacterium tuberculosis* and that it is a pure state (contaminant-free):

a. McFarland equivalent cell suspension - Isolates growing on an appropriate mycobacterial agar medium (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen) are scraped using a sterile loop and placed in a tube containing approximately 9 to 10 ml sterile distilled or deionized water and glass beads. The tube is capped, vortexed, and allowed to settle for 15 minutes. Approximately 5 ml of the top layer is removed, placed in a sterile test tube, and adjusted to a No. 1 McFarland equivalent (approximately 3.0×10^7 CFU/ml) using sterile distilled or deionized water. A 1:10 dilution of the adjusted sample is prepared using sterile distilled or deionized water. For the final inoculum, the organism is diluted 1:10.

b. VersaTREK Myco Seed Bottle - Prepare a No. 1.0 McFarland equivalent created from an agar or liquid source (growth in Middlebrook 7H9) of the test isolate. Aseptically inject 0.5 ml of this dilution 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 observed (approx. 10^6 CFU/ml). Once a positive signal is reached, the VersaTREK Connector is removed and the bottle is vortexed for 1-2 minutes. The seed bottle inoculum must be used within 72 hours of the positive instrument signal. Dilute the seed bottle 1:10.

3. Label each VersaTREK Myco culture bottle with Patient Identification or QC identifier. For Myco Susceptibility testing, 6 bottles will be used per isolate.

4. Disinfect the culture bottle stoppers with alcohol and aseptically add the following components into each culture bottle by injecting through the septum with a needle and locking syringe as described in Table 2. NOTE: Alternatively, these additions may be performed by opening the bottles and adding the reagents and sample using sterile pipettes. Care must be taken to maintain aseptic technique. The stopper and cap must be resealed properly to guarantee a sealed system. If the stopper and cap are not seated properly, a leak bottle error will occur.

Table 2: Reagent and Inoculum Additions to the Test Procedure

Label Myco Bottle with final concentration and patient identification number	Volume of diluted GS to add	Volume of diluted drug prepared in Table 1 to add	1:10 dilution from either source of prepared inoculum
1 µg/ml Rifampin	1 ml	0.5 ml Rifampin at 30µg/ml	0.5 ml
0.4 µg/ml Isoniazid	1 ml	0.5 ml Isoniazid at 12 µg/ml	0.5 ml
0.1 µg/ml Isoniazid	1 ml	0.5 ml Isoniazid at 3 µg/ml	0.5 ml
8 µg/ml Ethambutol	1 ml	0.5 ml Ethambutol at 240 µg/ml	0.5 ml
5 µg/ml Ethambutol	1 ml	0.5 ml Ethambutol at 150 µg/ml	0.5 ml
Control	1 ml	0.5 ml sterile distilled or deionized water	0.5 ml

5. Perform a purity check on the *Mycobacterium tuberculosis* inoculum by subculturing the organism suspension on both a Middlebrook 7H10 or 7H11 plate and a solid medium that will support the growth of most facultative bacteria, such as Blood Agar (BAP). Incubate the BAP for at least 18 hours in a conventional incubator and the Middlebrook agar for 4 weeks at 37°C.
 6. Wipe the culture bottles and stoppers with mycobactericidal disinfectant.
 7. Mix all bottles by inverting several times.
 8. 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 VersaTREK Connector is on the bottle. Fluid in the needle may interfere with the pressure readings for the bottle.
 9. Label each VersaTREK Myco bottle with Patient ID, Drug ID, and concentration. Recommended format for the accession number is "Access" XY, where "Access" equals the accession number for a particular isolate's susceptibility test, X equals the drug identifier, and Y equals the drug concentration. This labeling strategy will allow the user to retrieve the test results for each isolate group of bottles. You can use the "Access" portion of the number to search for and display the test results. Refer to the VersaTREK/ESP Culture System II Operator's Manual for details on bottle entry.
- | | | |
|----------|---------------------|-----------------------------|
| Example: | Control | Accession number = 1234C |
| | Rifampin 1.0 µg/ml | Accession number = 1234R1 |
| | Isoniazid 0.4 µg/ml | Accession number = 1234I0.4 |
10. Place the culture bottle with VersaTREK Connector into the instrument.
 11. Detection of growth is determined by the instrument and the time to detection can be obtained by reviewing the graph of the test result. The test should be completed in 13 days or less based on the drug-free control bottle.

RESULTS

For susceptibility testing using the VersaTREK/ESP Culture System II, an isolate is interpreted as being susceptible or resistant to a drug based on the following (round all times of detection to the nearest whole day):

1. After the drug-free bottle has become positive, record the time to detection (this is found on the graph of the test bottle).
2. Three additional days of incubation after the drug-free control has signaled positive, search and record the results from the other test bottles for the isolate.
3. **Susceptible:** An isolate in a drug-containing bottle that has not signaled within the three-day detection period of the drug-free control is determined to be susceptible at that drug concentration. Growth after the three days, rounded to the nearest whole number, of the growth control bottle signaling positive should be disregarded because it is not considered to be an indication of resistance. To round to the nearest whole number, if time \leq XX.49 is round down and if time \geq XX.50 is round up.
4. **Resistant:** Time to detection of drug bottle is \pm 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 \leq XX.49 is round down and if time \geq 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 4 example 2.

Bottles that signal positive should be stained for AFB (Acid Fast Bacilli) and the plates from the initial inoculum preparation that was subcultured to a Middlebrook 7H10 or 7H11 agar plate should be observed for growth at this time and for up to 4 weeks. If non-AFB smear organisms appear to be present, a subculture to a non-selective plate (e.g. BAP) should be done and incubated for at least 18 hours in a conventional incubator at 35°C to verify purity of the isolate. If it is necessary to repeat the testing, the subculture from the original inoculum for purity verification may be used. Test observations that determine the validity of the test are shown in Table 3. An example of results for determination of susceptibility is shown in Table 4.

TABLE 3: 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*	>10 days from inoculation	Non viable organism, too light inoculum	REPEAT TEST
Growth control	Growth detected between 3 and 10 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 10 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.

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.

Table 4: Examples of Results for Calculation of Susceptibility of *M. tuberculosis* Strains to VersaTREK Myco Susceptibility Kit Antibiotics

Example 1

Drug/ Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Control Positive	2				
Day Positive	4	5	7	5	No Growth
Result	Invalid Growth Control, Repeat Test				

Example 2

Drug/ Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Control Positive	5				
Day Positive	3	7	9	9	No Growth
Result	Resistant	Resistant	Susceptible	Susceptible	Susceptible

Example 3

Drug/ Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Control Positive	7				
Day Positive	8	11	No Growth	10	No Growth
Result	Resistant	Resistant	Susceptible	Resistant	Susceptible

Example 4

Drug/ Conc. (µg/ml)	Rifampin		Isoniazid		Ethambutol	
	1	0.1	0.4	5	8	
Control Positive	11					
Day Positive	9	11	No Growth	10	No Growth	
Result	Invalid Growth Control, Repeat Test					

LIMITATIONS

1. The ability of the VersaTREK/ESP Culture System II to detect resistance to low concentrations of Ethambutol with *Mycobacterium tuberculosis* is unknown because testing at the concentration of 5 µg/ml was not done during the test evaluation at the clinical sites.
2. The VersaTREK Myco Susceptibility Kit should not be used with isolates obtained directly from a positive specimen bottle (Primary Bottle).

EXPECTED RESULTS

109 Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* were tested for susceptibility to Rifampin (RIF), Ethambutol (ETH), and Isoniazid (INH) at 4 diverse sites using the Modified Agar Proportions (MAP) Method⁷ and the VersaTREK Myco Susceptibility Test System. Both methods detected 87 (79.8%) pan-susceptible strains. The MAP method detected 11 mono-resistant INH strains (10.1%), 9 Multiple Drug Resistant (MDR) Strains (8.2%), and 2 strains (1.8%) that were resistant to all three drugs. One strain was resistant to INH and ETH. The VersaTREK/ESP Culture System II detected 11 INH (10.1%) and 1 RIF (0.9%) monoresistant strains, 8 MDR strains (7.3%), one strain resistant to INH and ETH, and two strains (1.8%) that were resistant to all three drugs tested. According to the WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance⁶, the most common resistance patterns in the United States are mono-resistance to Isoniazid (INH) and Streptomycin (STR), followed by Multiple Drug Resistance (MDR). In the surveillance report, 87.1% of the strains tested were susceptible. The percent resistance to multiple drugs was 4.5%, of which 2% were MDR. These data are in line with the study results reported with VersaTREK.

QUALITY CONTROL

Each new VersaTREK Myco Susceptibility Kit should be tested with the quality control isolates listed in Table 5 prior to patient testing. Quality control strains should be tested the same as clinical isolates in the procedure for "Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Myco Susceptibility Testing." Results should be read as recommended in the Results section of this package insert. The following chart provides the expected results for the recommended quality control strains. If the expected results are not achieved, do not perform or report patient results using these lots. Contact TREK Technical Support at 1.800.642.7029 or 1.216-351.8735.

Table 5: QC Strains and Expected Results

Organism	ATCC	Rifampin	Isoniazid	Ethambutol
<i>M. tuberculosis</i>	25618	Susceptible	Susceptible	Susceptible
<i>M. tuberculosis</i>	35838	Resistant	–	–
<i>M. tuberculosis</i>	35822	–	Resistant	–
<i>M. tuberculosis</i>	35837	–	–	Resistant

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A comparison between VersaTREK/ESP Culture System II and the Agar Proportions Method⁷ was performed with a total of 109 clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* from four test sites. The test sites included an urban hospital with large HIV patient populations and high Mycobacteria test volume, two national TB referral hospitals with high volume of referral cultures, and a large university hospital. Testing was performed using three of the primary drugs for *M. tuberculosis* susceptibility testing: Rifampin, Isoniazid, and Ethambutol. Both VersaTREK Myco broth seeded and the McFarland standard methods of inoculation preparation were evaluated with similar results; therefore only one set of data is presented. Data from two strains were eliminated because of contamination; one strain from the VersaTREK/ESP Culture System II and one from the agar proportions method. The testing was performed on one concentration of Rifampin and two concentrations of Isoniazid and Ethambutol. Table 6 presents the agreement and 95% confidence intervals (CI) of the VersaTREK/ESP Culture System II with the agar proportions test results.

**Table 6: Clinical Study Results with the VersaTREK/ESP Culture System II
Compared to the Agar Proportions Method**

Drug	Agar Proportion Method			VersaTREK/ESP Culture System II				
	Concentration	# S	# R	Equivalent Concentration	Susceptible Strains		Resistant Strains	
					#Agreement	%Agreement (95% CI)	#Agreement	%Agreement (95% CI)
Rifampin	1 µg/ml	99	10	1 µg/ml	99	100 (96-100)	10	100 (69-100)
Isoniazid	0.2 µg/ml	85	24	0.1 µg/ml	85	100 (96-100)	23	95.8 (52-100)
	1 µg/ml	94	15	0.4 µg/ml	94	100 (96-100)	15	100 (79-99)
Ethambutol	5 µg/ml	104	4	5 µg/ml*	NT		NT*	
	10 µg/ml	105	3	8 µg/ml	105	100 (96-100)	3	100 (29-100)

* Repeat testing using the VersaTREK/ESP Culture System II for Ethambutol at 5 µg/ml gave a resistant result for the one isolate that was susceptible at 10 µg/ml but resistant at 5 µg/ml when tested with the Agar Proportions Method.
NT = Not Tested

HAZARD INFORMATION

Rifampin

Xn Harmful
R22 Harmful if swallowed.
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36/39 Wear suitable protective clothing and eye/face protection.

Isoniazid

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.

Ethambutol

Xn Harmful
R22 Harmful if swallowed.
S20 When using do not eat or drink.
S24/25 Avoid contact with skin and eyes.
S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

REFERENCES

1. Stratton, C.W. 1992. The Resurgence of Tuberculosis. *Int. Dis. Newsl.* 11:73-80.
2. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsburg, Jr., and R.C. Good, 1993. The Resurgence of Tuberculosis: Is Your Laboratory Ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-770.
3. CDC Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-care Facilities. 1994. *MMWR* 1994, 43 (No. RR-13)
4. 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.
5. Gilchrist, MJR, Biosafety Precautions for Airborne Pathogens. In: Flemng, D.O., J.H. Richardson, J.J. Rylis, D. Vesely, eds., *Laboratory Safety: Principles and Practices*, 2nd Edition. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press, 1991; 4:207-241.
6. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. The WHO/IUALTD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. 1994-1997.
7. Strong, B.E., and G.P. Kubica. 1981 Isolation and identification of Mycobacterium tuberculosis: A Guide for the Level II Laboratory. US Publication no. 81-9390. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.



For additional information, contact TREK Technical Support at 1.800.642.7029. Outside the U.S., call 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
44.1342.318777

L-TDST014-8
2010-07

VersaTREK® MYCO SUSCEPTIBILITY KIT, 7115-60

APLICACIONES PREVISTAS

El VersaTREK Myco Susceptibility Kit está destinado a la realización de pruebas de sensibilidad cualitativas *in vitro* de colonias aisladas de *Mycobacterium tuberculosis* con rifampicina, etambutol e isoniácida en el instrumento VersaTREK o el ESP Culture System II. Las fuentes de inóculo adecuadas se preparan para su crecimiento en agar sólido, como Middlebrook 7H10 o sesgos Lowenstein-Jensen o caldos Middlebrook 7H9.

RESUMEN Y DESCRIPCIÓN

El diagnóstico rápido de la tuberculosis es importante para iniciar el tratamiento farmacológico adecuado y para el establecimiento de medidas para evitar la propagación de esta enfermedad altamente contagiosa. Un retraso en el tratamiento, en especial para las cepas de *M. tuberculosis* (MDR-TB) resistentes a múltiples fármacos, puede ocasionar un fallo del tratamiento y la muerte de los pacientes.¹ Para solucionar estos problemas, se insta a los microbiólogos clínicos a que utilicen las pruebas de diagnóstico más rápidas y sensibles que permitan ofrecer resultados fiables. Los expertos de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) han realizado varias recomendaciones sobre las pruebas de micobacterias, y han incluido el uso de medios de cultivo líquidos y sólidos para el cultivo de micobacterias.²

Para las pruebas de sensibilidad *Mycobacterium tuberculosis*, el VersaTREK/ESP Culture System II combina un medio de cultivo líquido (caldo VersaTREK Myco), un suplemento de crecimiento (VersaTREK Myco GS) y antibióticos específicos con un sistema de detección que incuba automáticamente y monitoriza continuamente frascos de cultivo inoculados con aislados de *Mycobacterium tuberculosis* de varias muestras. Las esponjas en los frascos VersaTREK Myco proporcionan una matriz de soporte del crecimiento y aumentan el área de superficie expuesta al oxígeno del espacio de aire. La tecnología VersaTREK/ESP Culture System II está basada en la detección de cambios en la presión del espacio de aire en un frasco hermético debido al crecimiento microbiano. Se ha desarrollado un algoritmo especial para la detección de micobacterias de crecimiento muy lento.

Con el VersaTREK/ESP Culture System II, los fármacos antituberculosis se pueden inyectar en frascos VersaTREK Myco suplementados con VersaTREK Myco GS y aislados específicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Un inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* preparado a partir de colonias que han crecido en un medio sólido o a partir de un frasco de semillas se añade a un frasco de control sin fármaco, que se utiliza como control positivo, y a los frascos que contienen las concentraciones específicas de fármaco. La presencia de crecimiento se determina automáticamente por el instrumento, pero la determinación real de la sensibilidad o la resistencia se realiza mediante una comparación manual del frasco de control positivo sin fármaco y los frascos que contienen el fármaco. Si el organismo es sensible a un fármaco, se detectará un crecimiento retardado o la no existencia de crecimiento microbiano. Si el organismo es resistente a un fármaco, el crecimiento microbiano se detectará dentro de un tiempo especificado y se mostrará gráficamente en el instrumento, generándose una curva de consumo descendente. Los fármacos utilizados en este sistema son rifampicina, isoniácida, y etambutol en concentraciones específicas. Estos fármacos se suministran de forma liofilizada.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Las pruebas de sensibilidad de muestras de *Mycobacterium tuberculosis* se realizan con el VersaTREK/ESP Culture System II inoculando una suspensión de organismos en los frascos VersaTREK Myco que han sido suplementados con VersaTREK Myco GS y con uno de los tres fármacos principales. Un VersaTREK Connector se monta en cada frasco para establecer un sistema cerrado para controlar el frasco con el instrumento VersaTREK/ESP. Una membrana hidrofóbica en el VersaTREK Connector evita la formación de aerosol. La información clínica se introduce en el ordenador del sistema y el frasco se coloca adecuadamente en el instrumento para una incubación a 35 – 37 °C en condiciones estacionarias. El VersaTREK/ESP Culture System II detecta el crecimiento de micobacterias, controlando automáticamente (cada 24 minutos) el porcentaje de consumo de oxígeno dentro del espacio de aire del frasco de cultivo e indica la respuesta de crecimiento con una señal positiva. Al final del período de incubación especificado, según viene indicado por el frasco de control sin fármaco para cada aislado que se comprueba, se determina manualmente la sensibilidad o la resistencia a un fármaco del aislado.

REACTIVOS

El VersaTREK Myco Susceptibility Kit contiene dos frascos de rifampicina e isoniácida y tres frascos de etambutol en forma liofilizada. Cada frasco se rehidratará con 25 ml de agua destilada o desionizada estéril.

FÓRMULA TRAS LA HIDRATACIÓN*

(H2O)	Agua procesada	25 ml
(RIF)	Rifampicina	0,003% w/v
(SA)	Agente solubilizante	1,25% w/v
(H2O)	Agua procesada	25 ml
(INH)	Isoniácida	0,0012% w/v
(SA)	Agente solubilizante	1,25% w/v

(H2O)	Agua procesada	25 ml
(EMB)	Etambutol	0,024% 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. Las muestras pueden contener agentes infecciosos. Siga las precauciones universales y la normativa del centro a la hora de manipular y desechar los agentes infecciosos.
 4. Si se trabaja con *M. tuberculosis* en cultivos, se recomiendan las prácticas, equipos de contención e instalaciones de nivel 3 sobre seguridad biológica.^{3, 4, 5}
 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.
- Cumpla las normas de trabajo para la manipulación y eliminación de dispositivos contaminados con sangre. (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 bloqueo de aguja si utiliza este método de inoculación.
NOTA: La inoculación puede efectuarse abriendo los frascos y agregando la muestra mediante pipetas estériles.
 8. Esterilice en el autoclave todos los frascos de VersaTREK Myco antes de desecharlos.

ALMACENAMIENTO

VersaTREK Myco Susceptibility Kit: Guarde a 2-8°C. Proteja de la luz. Tras la rehidratación, guarde a 2-8°C y use antes de 4 semanas, o congele a -20°C y use antes de 3 meses. Una vez descongelado, no lo vuelva a congelar.

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 Susceptibility Kit	7115-60
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiales necesarios pero no suministrados:

Agua destilada o desionizada estéril
 Middlebrook 7H10 u otro agar micobacteriano o caldo de cultivo basado en huevos
 Autoclave
 Incubadora CO₂, 37°C
 Bucles estériles
 Jeringuillas de tuberculina estériles con agujas permanentemente colocadas
 Pipetas estériles o soporte de pipeta con puntas de pipetas estériles (opcional)
 Desinfectante micobactericida (ej.: AmphyTM, OMNITM, etc.)
 Tampones de alcohol
 Mezclador de vórtice
 Armazón de seguridad biológica
 Microscopio
 Materiales para muestras de tinción
 Organismos de control de calidad: *M. tuberculosis* ATCC[®] 25618, *M. tuberculosis* ATCC 35838, *M. tuberculosis* ATCC 35822, y *M. tuberculosis* ATCC 35837

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

1. Rehidrate los fármacos liofilizados agregando asépticamente 25 ml de agua destilada estéril o desionizada a cada vial de fármaco. Debe realizarse concentraciones de fármaco adicionales para los viales de isoniacida y etambutol, según se indica en la Tabla 1.

Tabla 1: Preparación de fármacos antituberculosis

Fármaco y concentración final en frascos Myco	Cantidad de diluyente añadido a las botellas liofilizadas	Concentración tras la rehidratación	Diluciones adicionales	Concentración que se inyectará en botellas de prueba	Número de pruebas/vial	Número de pruebas/Kit
Rifampicina 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ml	No	30 µg/ml	50	100
Isoniacida 0,4 µg/ml	25 ml	12µg/ml	No	12 µg/ml	40	80
Isoniacida 0,1 µg/ml			5 ml fármaco diluido más 15 ml de agua	3 µg/ml	40	80
Etambutol 8 µg/ml	25 ml	240µg/ml	No	240 µg/ml	30	90
Etambutol 5 µg/ml			10 ml fármaco diluido más 6 ml de agua	150 µg/ml	32	96

NOTA: Existe volumen suficiente para realizar 80 pruebas por kit. Las diluciones anteriores ofrecen un exceso de algunos fármacos en algunas concentraciones. Deseche las cantidades excesivas y no mezcle los componentes de este kit con diferentes números de lote o con otros kits.

2. El inóculo de una muestra para las pruebas de sensibilidad puede tener dos fuentes. Antes de preparar una prueba de sensibilidad en un aislado, se debe determinar que el aislado es *Mycobacterium tuberculosis* y que está en estado puro (sin contaminantes):

- Suspensión de células equivalentes McFarland – aislados que crecen en un agar de micobacterias adecuado (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen) se raspan utilizando un bucle estéril y se sitúan en un tubo que contiene aproximadamente 9 a 10 ml de agua destilada o desionizada estéril y gotas de vidrio. El tubo se cierra, se agita en vórtice y se deja asentar durante 15 minutos. Unos 5 ml de la capa superior se retira, se sitúa en un tubo de ensayo estéril y se ajusta a un equivalente N° 1 McFarland (aproximadamente $3,0 \times 10^7$ CFU/ml) utilizando agua destilada o desionizada estéril. Se prepara una dilución 1:10 de la muestra ajustada con agua destilada o desionizada estéril. Para el inóculo final, el organismo se diluye a 1:10.
- Botella de semillas VersaTREK Myco - Prepare un equivalente N° 1,0 McFarland a partir de un agar o medio líquido (crecimiento en Middlebrook 7H9) del aislado de prueba. Inyecte asépticamente 0,5 ml de esta dilución en un frasco de cultivo VersaTREK Myco suplementado con 1,0 ml VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK Connector estéril se coloca en el frasco y éste se incuba en el instrumento hasta que se observa una señal positiva (aprox. 10^6 CFU/ml). Cuando se alcanza la señal positiva, se retira el VersaTREK Connector y el frasco se agita en vórtice durante 1-2 minutos. El inóculo del frasco de semillas se debe utilizar antes de las 72 horas de la señal positiva del instrumento. Diluya el frasco de semillas a 1:10.

3. Etiquete cada frasco de cultivo VersaTREK Myco con la identificación del paciente o el identificador de Garantía de Calidad. Para las pruebas de sensibilidad a micobacterias, se utilizarán 6 frascos por aislado.

4. Desinfecte los tapones de los frascos de cultivo con alcohol y agregue asépticamente los siguientes componentes a cada frasco de cultivo inyectando a través del septo con una aguja y la jeringuilla, según se describe en la Tabla 2. NOTA: Estas adiciones también se pueden realizar abriendo los frascos y agregando los reactivos y la muestra mediante pipetas estériles. Se debe tener cuidado de mantener una técnica aséptica. El tapón y tapa deben volver a colocarse adecuadamente para garantizar un sistema hermético. Si el tapón y la tapa no están colocados adecuadamente, se producirá un error de pérdida en frasco.

Tabla 2: Adiciones de reactivo e inóculo al procedimiento de prueba

Etiquetar el frasco Myco con la concentración final y el número de identificación del paciente	Volumen de GS diluido para añadir	Volumen de fármaco diluido preparado Tabla 1 para añadir	Dilución del 1:10 de la fuente o el inóculo preparado
1 µg/ml Rifampicina	1 ml	0,5 ml Rifampicina a 30µg/ml	0,5 ml
0,4 µg/ml Isoniacida	1 ml	0,5 ml Isoniacida a 12 µg/ml	0,5 ml
0,1 µg/ml Isoniacida	1 ml	0,5 ml Isoniacida a 3 µg/ml	0,5 ml
8 µg/ml Etambutol	1 ml	0,5 ml Etambutol a 240 µg/ml	0,5 ml
5 µg/ml Etambutol	1 ml	0,5 ml Etambutol a 150 µg/ml	0,5 ml
Control	1 ml	0,5 ml agua destilada o desionizada estéril	0,5 ml

5. Realice una comprobación de pureza en el inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* subcultivando la suspensión del organismo en una placa Middlebrook 7H10 o 7H11 y un medio sólido que permita el crecimiento de la mayoría de bacterias facultativas, como agar sanguíneo (BAP). Incube el BAP durante 18 horas como mínimo en un incubador convencional y el agar Middlebrook durante 4 semanas a 37°C.
6. Limpie los frascos de cultivo y los topes con desinfectante micobactericida.
7. Mezcle todos los frascos, invirtiéndolos varias veces.
8. 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.
9. Etiquete cada frasco de VersaTREK Myco con la identificación de paciente, la identificación de fármaco y la concentración. El formato recomendado del número de referencia es "Acceso" XY, donde "Acceso" es igual al número de referencia de una prueba de sensibilidad del aislado específico, X es igual al identificador de fármaco e Y es igual a la concentración de fármaco. Este método de etiquetado permitirá al usuario recuperar los resultados de prueba para cada grupo de frascos de aislados. Puede utilizar la parte de "Acceso" del número para buscar y mostrar los resultados de prueba. Consulte el Manual del operario del VersaTREK/ESP Culture System II para obtener detalles sobre el registro de frascos.

Ejemplo:	Control	Número de referencia = 1234C
	Rifampicina 1,0 µg/ml	Número de referencia = 1234R1
	Isoniacida 0,4 µg/ml	Número de referencia = 1234I0,4

10. Ponga el frasco de cultivo con el VersaTREK Connector en el instrumento.
11. La detección del crecimiento se determina por el instrumento y el tiempo de detección se puede obtener analizando el gráfico del resultado de la prueba. La prueba se debe completar en 13 días o menos, según el frasco de control sin fármaco.

RESULTADOS

Para las pruebas de sensibilidad realizadas con el VersaTREK/ESP Culture System II, un aislado se interpreta como sensible o resistente a un fármaco basado en lo siguiente (redondee todos los tiempos de detección al día completo más próximo):

1. Después de que el frasco sin fármaco haya dado positivo, registre el tiempo de detección (se encuentra en el gráfico del frasco de prueba).
2. Tres días adicionales de incubación después de que el control sin fármaco haya dado positivo, busque y registre los resultados de los demás frascos de prueba del aislado.
3. **Susceptible:** un aislamiento en un frasco con fármaco que no ha dado señales en el periodo de detección de tres días del control sin fármaco se considera susceptible a esa concentración de fármaco. El crecimiento después de tres días, redondeados al número completo más próximo, del frasco de control del crecimiento que da positivo no debe tenerse en cuenta porque no se considera un indicador de resistencia. 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.
4. **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 señalizar antes que la botella de control; ver el ejemplo 2 en la Tabla 4.

Los frascos que den positivo deben ser teñidos para AFB (bacilos acidorresistentes) y se debe observar el crecimiento en las placas del preparado inicial de inóculo que se ha subcultivado en una placa de agar Middlebrook 7H10 o 7H11 en este momento y durante 4 semanas. Si no hay presentes organismos de frotis que no sean AFB, se debe realizar un subcultivo en una placa no selectiva (ej. BAP) e incubarse durante al menos 18 horas en una incubadora convencional a 35°C para verificar la pureza del aislado. Si es necesario repetir la prueba, se puede utilizar el subcultivo del inóculo original para la verificación de pureza. Las observaciones de pruebas que determinan la validez de las pruebas se muestran en la Tabla 3. Una ejemplo de los resultados para la determinación de la sensibilidad se muestra en la Tabla 4.

TABLA 3: 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*	>10 días desde la inoculación	Organismo no viable, inóculo demasiado débil	REPETIR PRUEBA
Control de crecimiento	Crecimiento detectado entre 3 y 10 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 intervalo superior de 10 días de tiempo de detección para el control de crecimiento ha sido establecido mediante datos clínicos y datos propios.

Asegúrese de comprobar los resultados de subcultivo en el agar de micobacterias para verificar que sólo hay presente una especie de micobacteria, especialmente si hay un resultado de resistencia.

Revise siempre el gráfico del aislado para determinar el tiempo de detección antes del informe. Si los gráficos de las pruebas que han dado positivo son anómalos, póngase en contacto en el Servicio de Asistencia Técnica de TREK en el número 1.216.351.8735.

Tabla 4: Ejemplos de resultados para el cálculo de la sensibilidad de cepas de *M. tuberculosis* a los antibióticos en el VersaTREK Myco Susceptibility Kit

Ejemplo 1

Fármaco / Conc. (µg/ml)	Rifampina	Isoniazida		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Control Positivo	2				
Positivo día	4	5	7	5	Sin crecimiento
Result	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba				

Ejemplo 2

Fármaco / Conc. (µg/ml)	Rifampina	Isoniazida		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Control Positivo	5				
Positivo día	3	7	9	9	Sin crecimiento
Resultado	Resistente	Resistente	Susceptible	Susceptible	Susceptible

Ejemplo 3

Fármaco / Conc. (µg/ml)	Rifampina	Isoniazida		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Control Positivo	7				
Positivo día	8	11	Sin crecimiento	10	Sin crecimiento
Resultado	Resistente	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible

Ejemplo 4

Fármaco / Conc. (µg/ml)	Rifampina	Isoniazida		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Control Positivo	11				
Positivo día	9	11	Sin crecimiento	10	Sin crecimiento
Resultado	Control de crecimiento inválido. Repetir prueba				

LIMITACIONES

1. La capacidad del VersaTREK/ESP Culture System II de detectar resistencia a las concentraciones bajas de etambutol con *Mycobacterium tuberculosis* es desconocida, ya que no se ha realizado una prueba a una concentración de 5 µg/ml durante la evaluación de las pruebas en las ubicaciones clínicas.
2. El VersaTREK Myco Susceptibility Kit no debe utilizarse con aislado obtenidos directamente de un frasco de muestra positiva (botella principal).

RESULTADOS PREVISTOS

Se comprobó la sensibilidad de 109 cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* a la Rifampicina (RIF), Etambutol (ETH) e Isoniacida (INH) en 4 ubicaciones diferentes utilizando el Método de Proporciones Modificadas de Agar (MAP)⁷ y el Sistema de Prueba de Sensibilidad VersaTREK Myco. Los dos métodos detectaron 87 (79,8%) cepas sensibles. El método MAP detectó 11 cepas INH monorresistentes (10,1%), 9 cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR) (8,2%), y 2 cepas (1,8%) resistentes a los tres fármacos. Una cepa fue resistente a INH y ETH. El VersaTREK/ESP Culture System II detectó 11 cepas monorresistentes a INH (10,1%) y 1 RIF (0,9%), 8 cepas MDR (7,3%), una cepa resistente a INH y ETH, y dos cepas (1,8%) resistentes a los tres fármacos comprobados. Según el Proyecto Global WHO/IUALTD sobre el Seguimiento a la Resistencia de Fármacos Antituberculosis⁶, las pautas más comunes a la resistencia en los Estados Unidos son la monorresistencia a la isoniacida (INH) y estreptomina (STR), seguido por la Resistencia a Múltiples Fármacos (MDR). En el informe de seguimiento, 87,1% de las cepas comprobadas eran sensibles. El porcentaje de resistencia a múltiples fármacos era del 4,5%, de los que el 2% era MDR. Estos datos coinciden con los resultados de los estudios del VersaTREK.

CONTROL DE CALIDAD

Cada nuevo VersaTREK Myco Susceptibility Kit deben ser comprobados con los aislados de control de calidad indicados en la Tabla 5 antes de la realización de pruebas en pacientes. Las cepas de control de calidad deben ser comprobadas de igual forma que los aislados clínicos en el procedimiento de "Inoculación de frascos de cultivo VersaTREK Myco para las pruebas de sensibilidad a micobacterias". Los resultados deben ser leídos según lo recomendado en la sección de Resultados de esta documentación del paquete. El cuadro siguiente proporciona los resultados previstos de las cepas de control de calidad recomendadas. Si no se obtienen los resultados previstos, no realice ni emita resultados de pacientes con estos lotes. Póngase en contacto con el Servicio de Asistencia Técnica de TREK en el número 1.216-351.8735.

Tabla 5: Cepas de control de calidad y resultados previstos

Organismo	ATCC	Rifampicina	Isoniacida	Etambutol
<i>M. tuberculosis</i>	25618	Sensible	Sensible	Sensible
<i>M. tuberculosis</i>	35838	Resistente	–	–
<i>M. tuberculosis</i>	35822	–	Resistente	–
<i>M. tuberculosis</i>	35837	–	–	Resistente

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se realizó una comparación entre el VersaTREK/ESP Culture System II y el Método de Proporciones de Agar⁷ con un total de 109 cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* en cuatro ubicaciones de pruebas. Las ubicaciones de pruebas incluyeron un hospital urbano con una gran cantidad de pacientes con VIH y un elevado volumen de pruebas de micobacterias, dos hospitales nacionales de tratamiento de tuberculosis con un alto volumen de cultivos y un hospital universitario de gran tamaño. Las pruebas se realizaron utilizando tres de los fármacos principales para las pruebas de sensibilidad a la *M. tuberculosis*: Rifampicina, Isoniacida y Etambutol. Los dos caldos de cultivo VersaTREK Myco inocularon y los métodos estándar de preparación de inoculación McFarland fueron evaluados con resultados similares; por lo tanto, sólo se presenta un conjunto de datos. Los datos de dos cepas fueron eliminados debido a contaminación: una cepa del VersaTREK/ESP Culture System II y una cepa del método de proporciones de agar. Las pruebas se realizaron en una concentración de Rifampicina y dos concentraciones de Isoniacida y Etambutol. La Tabla 6 indica la conformidad y los intervalos de confianza (CI) del 95% del VersaTREK/ESP Culture System II con los resultados de las pruebas de proporciones de agar.

Tabla 6: Resultados de estudios clínicos con el VersaTREK/ESP Culture System II en comparación con el Método de Proporciones de Agar

Fármaco	Método de Proporciones de Agar			VersaTREK/ESP Culture System II				
	Concentración	# S	# R	Concentración equivalente	Cepas sensibles		Cepas resistentes	
					#Concordancia	% Concordancia (95% CI)	# Concordancia	% Concordancia (95% CI)
Rifampicina	1 µg/ml	99	10	1 µg/ml	99	100 (96-100)	10	100 (69-100)
Isoniacida	0,2 µg/ml	85	24	0,1 µg/ml	85	100 (96-100)	23	95,8 (52-100)
	1 µg/ml	94	15	0,4 µg/ml	94	100 (96-100)	15	100 (79-99)
Etambutol	5 µg/ml	104	4	5 µg/ml*	NC		NC*	
	10 µg/ml	105	3	8 µg/ml	105	100 (96-100)	3	100 (29-100)

* Las pruebas repetidas con el VersaTREK/ESP Culture System II par el etambutol a 5 µg/ml dieron un resultado resistente para el aislado que era sensible a 10 µg/ml pero resistente a 5 µg/ml cuando se hizo la prueba con el Método de Proporciones de Agar. NC = No comprobado

INFORMACIÓN DE RIESGOS

Rifampicina

Xn Nocivo
 R22 Nocivo por ingestión.
 S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
 S36/39 Úsense indumentaria adecuada y protección para los ojos/la cara.

Isoniacida

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

Etambutol

Xn Nocivo
 R22 Nocivo por ingestión.
 S20 No comer ni beber durante su utilización.
 S24/25 Evítense el contacto con los ojos y la piel.
 S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

BIBLIOGRAFÍA: pg. 8

Para obtener información adicional, llame al Servicio de Asistencia Técnica de TREK al número 1.800.642.7029. Fuera de los EE.UU., llame al 1.216.351.8735.

Italiano

VersaTREK® MYCO SUSCEPTIBILITY KIT, 7115-60

USO PREVISTO

Il VersaTREK Myco Susceptibility Kit è previsto per il test qualitativo di suscettibilità *in vitro* di colonie isolate di *Mycobacterium tuberculosis* con rifampicina, etambutolo e isoniazide utilizzando lo strumento VersaTREK o ESP Culture System II. Sorgenti di inoculo appropriate vengono preparate mediante crescita su agar solido, quale Middlebrook 7H10 o inclinati Lowenstein-Jensen, o brodo Middlebrook 7H9.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Una diagnosi tempestiva di tubercolosi è necessaria per l'inizio di un'adeguata terapia farmacologica e al fine di adottare misure atte a prevenire la diffusione di tale disturbo a elevato contagio. Un intervento tardivo, in particolare delle specie resistenti a trattamento farmacologico multiplo *M. tuberculosis* (MDR-TB), può provocare un insuccesso nel trattamento e la morte del paziente¹. Per questi problemi, ai microbiologi clinici viene chiesto di utilizzare i test diagnostici più rapidi e sensibili in grado di fornire risultati attendibili. Gli esperti dei Centri federali per il Controllo delle Malattie (CDC) hanno divulgato numerosi consigli riguardo i test micobatterici compreso l'utilizzo di medium sia solido che liquido per la coltura micobatterica².

Per il test di suscettibilità del *Mycobacterium tuberculosis*, il VersaTREK/ESP Culture System II combina un terreno di coltura liquido (brodo VersaTREK Myco), un supplemento di crescita (VersaTREK Myco GS) e antibiotici specifici con un sistema di rilevazione che procede all'incubazione automatica e al monitoraggio continuato dei flaconi di coltura inoculati con isolati di *Mycobacterium tuberculosis* provenienti da varie sorgenti campione. Le spugne nei flaconi di VersaTREK Myco forniscono una matrice di supporto alla crescita e aumentano l'area di superficie esposta all'ossigeno presente nella parte superiore dei flaconi. La tecnologia del VersaTREK/ESP Culture System II si basa sulla rilevazione delle variazioni di pressione dovuta a crescite microbiche, nella parte superiore all'interno di un flacone sigillato. Per il rilevamento di micobatteri a crescita molto lenta è stato elaborato uno speciale algoritmo.

Con il VersaTREK/ESP Culture System II, i farmaci antitubercolosi possono essere iniettati in flaconi VersaTREK Myco a cui siano stati aggiunti VersaTREK Myco GS e specifici isolati di *Mycobacterium tuberculosis*. Un inoculo di *Mycobacterium tuberculosis*, prelevato da colonie cresciute su un terreno di coltura solido o da un flacone di germi, viene aggiunto sia ad un flacone di controllo libero da farmaco, utilizzato come controllo positivo, che ai flaconi contenenti concentrazioni specifiche di farmaco. La presenza di crescita viene rilevata dallo strumento automaticamente, ma per determinare l'effettiva suscettibilità o resistenza è necessario confrontare manualmente il flacone di controllo positivo libero da farmaco e i flaconi contenenti il farmaco. Se l'organismo è sensibile ad un farmaco, non saranno rilevate né una crescita microbica, né una crescita tardiva. Se l'organismo è resistente ad un farmaco, entro un arco di tempo specifico sarà rilevata una crescita microbica, visualizzata graficamente sullo strumento come una curva discendente di consumo. I farmaci utilizzati in questo sistema sono i farmaci primari rifampicina, isoniazide e etambutolo, in concentrazioni specifiche. Tali farmaci sono forniti in forma liofilizzata.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I test di suscettibilità di campioni di *Mycobacterium tuberculosis* vengono eseguiti con il VersaTREK/ESP Culture System II inoculando una sospensione di organismi in flaconi VersaTREK Myco a cui siano stati aggiunti VersaTREK Myco GS e uno dei tre farmaci primari. Un VersaTREK Connector è collegato a ciascun flacone per stabilire un sistema chiuso che consenta di monitorare il flacone con lo strumento VersaTREK/ESP. Una membrana idrofobica nel VersaTREK Connector previene l'aerosolizzazione. Le informazioni cliniche vengono inserite nel computer del sistema, e quindi il flacone viene adeguatamente posto nello strumento per l'incubazione a 35 – 37 ° C in condizioni stabili. Il VersaTREK/ESP Culture System II rileva crescite micobatteriche monitorando automaticamente (ogni 24 minuti) la velocità di consumo dell'ossigeno all'interno della parte alta del flacone di coltura registrando la segnalazione della crescita con un segnale positivo. Al termine del periodo di incubazione specificato, quando determinato dal flacone di controllo libero da farmaco per ciascun isolato sottoposto a test, la sensibilità o la resistenza dell'isolato ad un determinato farmaco viene stabilita manualmente.

REAGENTI

Il VersaTREK Myco Susceptibility Kit contiene due flaconi entrambi contenenti rifampicina e isoniazide e tre flaconi di etambutolo in forma liofilizzata. Ogni flacone deve essere reidratato con 25 ml di acqua deionizzata o distillata sterile.

FORMULA IN CASO DI REIDRATAZIONE*

(H2O)	Acqua trattata	25 ml
(RIF)	Rifampicina	0,003% p/v
(SA)	Agente solubilizzante	1,25% p/v
(H2O)	Acqua trattata	25 ml
(INH)	Isoniazide	0,0012% p/v
(SA)	Agente solubilizzante	1,25% p/v

(H ₂ O)	Acqua trattata	25 ml
(EMB)	Etambutolo	0,024% p/v
(SA)	Agente solubilizzante	1,25% p/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.** I campioni potrebbero contenere agenti infettivi. Per la manipolazione e lo smaltimento di agenti infettivi, attenersi alle normative istituzionali.
4. Lavorando con *M. tuberculosis* cresciuto in coltura, la raccomandazione è valida per le norme, le apparecchiature di contenimento, e le attrezzature di Livello di Sicurezza Biologica 3.^{3, 4, 5}
5. Il VersaTREK Connector contiene un ago rientrante sterile subito dopo la rimozione del sigillo, ma potenzialmente contaminato subito dopo l'utilizzo.

Per la manipolazione e lo smaltimento di dispositivi contaminati con sangue, attenersi alle normative istituzionali. (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. Se si ricorre a questo metodo di inoculazione, utilizzare solo siringhe con sistema di bloccaggio ago.
NOTA: L'inoculazione può essere eseguita aprendo i flaconi e aggiungendo i campioni utilizzando delle pipette sterili.
8. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi di VersaTREK Myco prima dello smaltimento.

CONSERVAZIONE

VersaTREK Myco Susceptibility Kit: 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 Susceptibility Kit:	7115-60
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiali richiesti ma non forniti:

Acqua distillata o deionizzata sterile.

Middlebrook 7H10 o altro agar micobatterico o medium a base di uovo.

Autoclave

Incubatrice alla CO₂, a 37°C

Anse sterili

Siringhe sterili per tubercolina con aghi permanenti

Pipette sterili con punte di pipette sterili (opzionali)

Disinfettante micobatterico (cioè, AmphylTM, OMNITM, ecc.)

Tamponi imbevuti di alcool

Mescolatore vortice

Cabina di sicurezza biologica

Microscopio

Materiali per la colorazione dei vetrini

Organismi con Controllo di Qualità: *M. tuberculosis* ATCC[®] 25618, *M. tuberculosis* ATCC 35838, *M. tuberculosis* ATCC 35822, e *M. tuberculosis* ATCC 35837

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

1. Reidratare i farmaci liofilizzati aggiungendo asetticamente 25 ml di acqua deionizzata o distillata sterile a ciascuna fiala di farmaco. Se si utilizzano fiale contenenti isoniazide e etambutolo, l'aggiunta di concentrazioni del farmaco deve essere eseguita attenendosi alle istruzioni nella Tabella 1.

TABELLA 1: Preparazione del farmaco antitubercolosi

Concentrazione del farmaco e concentrazione finale nei flaconi Myco	Quantità di diluente aggiunto ai flaconi liofilizzati	Concentrazion e dopo la reidratazione	Diluizioni aggiuntive	Concentrazione da iniettare nei flaconi per il test	Numero di test/fiala	Numero di test/Kit
Rifampicina 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ml	No	30 µg/ml	50	100
Isoniazide 0,4 µg/ml Isoniazide 0,1 µg/ml	25 ml	12µg/ml	No 5 ml di farmaco diluito più 15 ml di acqua	12 µg/ml 3 µg/ml	40 40	80 80
Etambutolo 8 µg/ml Etambutolo 5 µg/ml	25 ml	240µg/ml	No 10 ml di farmaco diluito più 6 ml di acqua	240 µg/ml 150 µg/ml	30 32	90 96

NOTA: Esiste volume sufficiente per eseguire 80 test per ciascun kit. Le diluizioni indicate nella Tabella forniscono un eccesso di alcuni dei farmaci in alcune concentrazioni. Eliminare le quantità in eccesso e non mischiare componenti di questo kit con numeri di lotto differenti di altri kit.

2. L'inoculo di un campione per il test di suscettibilità può essere prelevato da due sorgenti. Prima di sottoporre al test di suscettibilità un isolato, è necessario accertare che l'isolato sia un *Mycobacterium tuberculosis* e che il suo stato sia puro (privo di contaminante):

a. Sospensione cellulare equivalente McFarland – Gli isolati che crescono su un appropriato medium agar micobatterico (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen) devono essere prelevati utilizzando un'ansa sterile collocata in un tubo contenente da 9 a 10 ml circa di acqua deionizzata o distillata sterile e perline di vetro. Il tubo deve essere capovolto, agitato vorticosamente, quindi lasciato riposare per 15 minuti. Circa 5 ml dello strato superiore vanno rimossi, collocati in un tubo sterile per test, quindi regolati su un equivalente McFarland n.1 (circa $3,0 \times 10^7$ CFU/ml) utilizzando acqua deionizzata o distillata sterile. Una diluizione 1:10 del campione regolato viene preparata utilizzando acqua deionizzata o distillata sterile. Per l'inoculo finale, l'organismo è diluito 1:10.

b. Flacone con batteri VersaTREK Myco – Preparare un equivalente creato da una sorgente agar o liquida (crescita in Middlebrook 7H9) dell'isolato per il test. Iniettare asetticamente 0,5 ml di questa diluizione in un flacone di coltura Myco VersaTREK a cui siano stati aggiunti 1,0 ml VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK Connector sterile viene collocato sul flacone e il flacone è mantenuto incubato nello strumento fino a quando non compare un segnale positivo (circa 10^6 CFU/ml). Una volta raggiunto un segnale positivo, il connettore VersaTREK viene rimosso e il flacone agitato vorticosamente per 1-2 minuti. L'inoculo del flacone contenente i batteri deve essere utilizzato entro 72 ore dal raggiungimento del segnale positivo sullo strumento. Diluire il flacone contenente i batteri di 1:10.

3. Etichettare ciascun flacone di coltura VersaTREK Myco con l'Identificazione Paziente (ID) o l'identificatore QC. Per il test di suscettibilità Myco è necessario utilizzare 6 flaconi per ciascun isolato.

4. Disinfettare i tappi dei flaconi di coltura con alcool e aggiungere asetticamente in ciascun flacone di coltura i componenti indicati nel seguito, iniettandoli nel setto con un ago e una siringa a bloccaggio, come descritto nella Tabella 2. NOTA: In alternativa, tali aggiunte possono essere eseguite aprendo i flaconi e aggiungendo i reagenti e i campioni utilizzando delle pipette sterili. Avere cura di mantenere la tecnica asettica. Il tappo deve essere adeguatamente rimesso in sede per garantire un sistema stagno. Se il tappo non è adeguatamente messo in sede, si verificherà una perdita dal flacone.

Tabella 2: Aggiunte di reagenti e di inoculo per la procedura di test

Etichettare il flacone Myco con la concentrazione finale e il numero di identificazione del paziente	Volume di GS diluito da aggiungere	Volume di farmaco diluito preparato secondo la Tabella 1 da aggiungere	Diluizione 1:10 da una delle sorgenti di inoculo preparato
1 µg/ml Rifampicina	1 ml	0,5 ml Rifampicina a 30µg/ml	0,5 ml
0,4 µg/ml Isoniazide	1 ml	0,5 ml Isoniazide a 12 µg/ml	0,5 ml
0,1 µg/ml Isoniazide	1 ml	0,5 ml Isoniazide a 3 µg/ml	0,5 ml
8 µg/ml Etambutolo	1 ml	0,5 ml Etambutolo a 240µg/ml	0,5 ml

Etichettare il flacone Myco con la concentrazione finale e il numero di identificazione del paziente	Volume di GS diluito da aggiungere	Volume di farmaco diluito preparato secondo la Tabella 1 da aggiungere	Diluizione 1:10 da una delle sorgenti di inoculo preparato
5 µg/ml Etambutolo	1 ml	0,5 ml Etambutolo a 150µg/ml	0,5 ml
Controllo	1 ml	0,5 ml Acqua distillata o deionizzata sterile	0,5 ml

5. Eseguire un controllo di purezza sull'inoculo *Mycobacterium tuberculosis* mediante una sottocoltura della sospensione di organismi sia su una piastra Middlebrook 7H10 o 7H11 che su un terreno solido, che supporti la crescita della maggior parte dei batteri facoltativi, quale Blood Agar (BAP). Incubare il BAP per almeno 18 ore in un incubatore tradizionale e l'agar Middlebrook per 4 settimane a 37°C.

6. Pulire i flaconi di coltura e i tappi con disinfettante micobatterico.

7. Mescolare tutti i flaconi invertendo più volte.

8. 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.

9. Etichettare ciascun flacone VersaTREK Myco con l'ID Paziente, l'ID Farmaco e la concentrazione. Il formato raccomandato per il numero di accessione è "Access" XY, dove "Access" equivale al numero di accessione per un test di suscettibilità relativo ad un particolare isolato, X equivale all'identificatore del farmaco e Y equivale alla concentrazione del farmaco. Questo tipo di etichettatura consente all'utente di rintracciare facilmente i risultati di test per ciascun gruppo di isolati dei flaconi. La parte "Access" del numero consente di individuare e visualizzare i risultati di test. Per informazioni dettagliate sull'accesso ai flaconi, consultare il Manuale Operatore VersaTREK/ESP Culture System II.

Esempio:

Controllo	Numero di accessione = 1234C
Rifampicina 1,0 µg/ml	Numero di accessione = 1234R1
Isoniazide 0,4 µg/ml	Numero di accessione = 1234I0.4

10. Posizionare il flacone di coltura con VersaTREK Connector nello strumento.

11. La rilevazione di crescita è determinata dallo strumento e il tempo necessario per la rilevazione è visualizzato sul grafico che mostra il risultato del test. Il test deve essere portato a termine entro 13 giorni o anche meno, a seconda del flacone di controllo libero da farmaco.

RISULTATI

Se si esegue il test di suscettibilità utilizzando il VersaTREK/ESP Culture System II, la determinazione della sensibilità o della resistenza di un isolato ad un farmaco specifico si basa sulla seguente procedura (arrotondare i tempi di rilevazione rispetto alla giornata intera più vicina):

1. Una volta divenuto positivo il flacone libero da farmaco, registrare il tempo che è stato necessario per la rilevazione (individuabile sul grafico del flacone positivo).

2. Trascorsi ulteriori tre giorni di incubazione dal momento in cui il controllo in assenza di farmaco ha dato riscontro positivo, individuare e registrare i risultati relativi agli altri flaconi di test utilizzati per l'isolato.

3. **Farmacosensibile:** Viene definito sensibile alla concentrazione specifica del farmaco un isolato che, presente nello stesso flacone del farmaco, non abbia evidenziato segnali di crescita entro il periodo di rilevamento di tre giorni stabilito per il controllo senza farmaco. Non si dovrà invece tener conto di una crescita che dovesse verificarsi dopo tre giorni (arrotondati al numero intero più vicino) nel flacone del controllo di crescita con segnale positivo, in quanto tale crescita non viene considerata un indice di resistenza. 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.

4. **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 4 esempio 2.

I flaconi che forniscono un segnale positivo dovrebbero essere colorati per AFB (Bacilli acidoresistenti) e le piastre provenienti dalla preparazione di inoculo iniziale sottoposto a sottocoltura con una piastra agar Middlebrook 7H10 o 7H11 dovrebbero essere tenute sotto osservazione in questo periodo di tempo e per un periodo fino a 4 settimane. Se non si riscontra la presenza di organismi AFB sulla macchia, si dovrebbe procedere ad una sottocoltura con una piastra non selettiva (ossia BAP), incubandola per almeno 18 ore in un incubatore tradizionale a 35°C per verificare la purezza dell'isolato. Nel caso in cui sia necessario ripetere il test, può essere utilizzata la sottocoltura proveniente dall'inoculo originale per verificare la purezza. Le osservazioni durante il test che determinano la validità del test stesso sono mostrate nella Tabella 3. Un esempio di risultati per la determinazione di suscettibilità è mostrato nella Tabella 4.

TABELLA 3: 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*	>10 giorni dall'inoculazione	Microrganismo non vitale o inoculo troppo leggero	RIPETERE IL TEST
Controllo di crescita	Crescita rilevata tra i 3 e i 10 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

* L'intervallo superiore ad un periodo di rilevazione di 10 giorni per il controllo di crescita è stato stabilito con dati clinici e locali.

Accertarsi di controllare i risultati delle sottocolture su agar micobatterico per verificare che fosse presente solo una specie di micobatterio, soprattutto se il risultato è di farmacoresistenza.

Revisionare sempre il grafico dell'isolato per determinare il tempo necessario per la rilevazione, prima di riportare i risultati. Se i grafici dei test in cui si è verificata una segnalazione positiva hanno un aspetto anomalo, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1.216.351.8735.

Tabella 4: Esempi di risultati per il calcolo di suscettibilità di ceppi *M. tuberculosis* ad antibiotici VersaTREK Myco Susceptibility Kit

Esempio 1

Farmaco / Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Controllo Positivo	2				
Giorno Positivo	4	5	7	5	Nessuna crescita
Risultato	Controllo della crescita non valida, ripetere il test				

Esempio 2

Farmaco / Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Controllo Positivo	5				
Giorno Positivo	3	7	9	9	Nessuna crescita
Risultato	Resistente	Resistente	Sensibile	Sensibile	Sensibile

Esempio 3

Farmaco / Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Controllo Positivo	7				
Giorno Positivo	8	11	Nessuna crescita	10	Nessuna crescita
Risultato	Resistente	Resistente	Sensibile	Resistente	Sensibile

Esempio 4

Farmaco / Conc. (µg/ml)	Rifampin	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Controllo Positivo	11				
Giorno Positivo	9	11	Nessuna crescita	10	Nessuna crescita
Risultato	Controllo della crescita non valida, ripetere il test				

LIMITAZIONI

1. L'abilità del VersaTREK/ESP Culture System II nel rilevare resistenza a basse concentrazioni di Etambutolo con *Mycobacterium tuberculosis* non è nota, poiché la verifica su una concentrazione di 5 µg/ml non è stata eseguita durante la valutazione del test presso i siti clinici.
2. Il VersaTREK Myco Susceptibility Kit non dovrebbe essere utilizzato con isolati ottenuti direttamente da un flacone di campione positivo (flacone primario).

RISULTATI PREVISTI

109 Ceppi clinici di *Mycobacterium tuberculosis* sono stati sottoposti al test di suscettibilità a rifampicina (RIF), etambutolo (ETH) e isoniazide (INH) in 4 diversi siti utilizzando il Metodo con Proporzioni di Agar Modificate (MAP)⁷ e il Sistema di Test di Suscettibilità VersaTREK Myco. Entrambi i metodi hanno rilevato 87 (79,8%) ceppi con sensibilità totale. Il metodo MAP ha rilevato 11 ceppi (10,1%) resistenti ad un solo trattamento farmacologico INH, 9 ceppi (8,2%) resistenti a trattamento farmacologico multiplo (MDR) e 2 ceppi (1,8%) resistenti a tutti e tre i farmaci. Un solo ceppo era resistente a INH e ETH. Il VersaTREK/ESP Culture System II ha rilevato 11 ceppi resistenti ad unico trattamento farmacologico INH (10,1%), 1 ceppo resistente ad unico trattamento farmacologico RIF (0,9%), 8 ceppi MDR (7,3%), un solo ceppo resistente a INH e ETH e due ceppi (1,8%) resistenti a tutti e tre i farmaci. Secondo il Progetto Globale di Sorveglianza della Resistenza ai Farmaci Antitubercolosi WHO/IUALTD⁶, le tipologie di resistenza riscontrate più comunemente negli Stati Uniti sono la resistenza ad unico trattamento farmacologico con isoniazide (INH) e con streptomina (STR), seguite dalla resistenza a trattamento farmacologico multiplo (MDR). Nel resoconto della sorveglianza, 87,1% dei ceppi sottoposti a test risultavano farmacosensibili. La resistenza a trattamento farmacologico multiplo espresso in percentuale era pari al 4,5%, di cui il 2% MDR. Questi dati sono in linea con i risultati dello studio riportati con VersaTREK.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni nuovo VersaTREK Myco Susceptibility Kit dovrebbero essere testati con gli isolati per il controllo di qualità elencati nella Tabella 5, prima di eseguire il test su paziente. I ceppi per il controllo di qualità dovrebbero essere testati allo stesso modo degli isolati clinici nella procedura di "Inoculazione di flaconi di coltura VersaTREK Myco per il test di suscettibilità Myco". La lettura dei risultati deve attenersi alle istruzioni fornite nella sezione Risultati della documentazione allegata. Il grafico successivo presenta i risultati previsti per i ceppi del controllo qualità raccomandati. Se i risultati sono diversi da quelli previsti, si raccomanda di non elaborare o registrare alcun risultato utilizzando questi lotti. Contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1.216.351.8735.

Tabella 5: Ceppi QC e risultati previsti

Organismo	ATCC	Rifampicina	Isoniazide	Etambutolo
<i>M. tuberculosis</i>	25618	Sensibile	Sensibile	Sensibile
<i>M. tuberculosis</i>	35838	Resistente	–	–
<i>M. tuberculosis</i>	35822	–	Resistente	–
<i>M. tuberculosis</i>	35837	–	–	Resistente

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Un confronto tra il VersaTREK/ESP Culture System II e il Metodo delle Proporzioni di Agar⁷ è stato eseguito per un totale di 109 ceppi clinici di *Mycobacterium tuberculosis* provenienti da quattro siti in cui è stato svolto il test. I siti del test includevano un ospedale urbano con ampie popolazioni di pazienti HIV e un alto volume di test su micobatteri, due ospedali di riferimento nazionali TB con un elevato volume di colture di riferimento e un grande ospedale universitario. Per il test sono stati utilizzati tre dei farmaci primari impiegati nell'analisi della suscettibilità del *M. tuberculosis*: rifampicina, isoniazide e etambutolo. Per entrambi i metodi di coltura su brodo VersaTREK Myco e McFarland standard sono stati riscontrati dei risultati simili, per cui è stato elaborato un unico insieme di dati. I dati relativi a due ceppi sono stati eliminati per la presenza di contaminazione; un ceppo era proveniente dal VersaTREK/ESP Culture System II ed un altro dal metodo con proporzioni di agar. Il test è stato eseguito con una concentrazione di rifampicina e due concentrazioni di isoniazide e etambutolo. La Tabella 6 presenta la concordanza e il 95% degli intervalli di confidenza (CI) del VersaTREK/ESP Culture System II con i risultati di test per proporzioni di agar.

Tabella 6: Risultati dello studio clinico con il VersaTREK/ESP Culture System II confrontati al Metodo con Proporzioni di Agar

Farmaco	Metodo con Proporzioni di Agar			VersaTREK/ESP Culture System II				
	Concentrazion e	# S	# R	Concentrazion e equivalente	Ceppi sensibili		Ceppi resistenti	
					#Concordanz a	%Concordanz a (95% CI)	#Concordanz a	%Concordanz a (95% CI)
Rifampicina	1 µg/ml	99	10	1 µg/ml	99	100 (96-100)	10	100 (69-100)
Isoniazide	0,2 µg/ml	85	24	0,1 µg/ml	85	100 (96-100)	23	95,8 (52-100)
	1 µg/ml	94	15	0,4 µg/ml	94	100 (96-100)	15	100 (79-99)
Etambutolo	5 µg/ml	104	4	5 µg/ml*	NT		NT*	
	10 µg/ml	105	3	8 µg/ml	105	100 (96-100)	3	100 (29-100)

* La ripetizione del test utilizzando il VersaTREK/ESP Culture System II per etambutolo a 5 µg/ml ha determinato un risultato di resistenza per l'unico isolato che era sensibile a 10 µg/ml ma resistente a 5 µg/ml quando testato con il metodo di proporzioni di agar.

NT = Non testato

INFORMAZIONI SUI RISCHI

Rifampicina

- Xn Nocivo
- R22 Nocivo per ingestione
- S26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.
- S36/39 Usare indumenti protettivi adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

Isoniazide

- 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.

Etambutolo

- Xn Nocivo
- R22 Nocivo per ingestione
- S20 Non mangiare né bere durante l'impiego.
- S24/25 Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.
- S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: pg. 8

Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1.216.351.8735. Fuori degli Stati Uniti, chiamare 1.216.351.8735.

Français

VersaTREK® MYCO SUSCEPTIBILITY KIT, 7115-60

UTILISATION PRÉVUE

Le VersaTREK Myco Susceptibility Kit est destiné au test qualitatif de la sensibilité *in vitro* de colonies isolées de *Mycobacterium tuberculosis* à la rifampicine, à l'éthambutol et à l'isoniazide avec l'instrument VersaTREK ou le ESP Culture System II. Des sources d'inoculum appropriées sont préparées à partir d'une croissance sur gélose solide, comme les milieux de Middlebrook 7H10 ou de Lowenstein-Jensen, ou sur le bouillon de Middlebrook 7H9.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Un diagnostic rapide de la tuberculose est un facteur important de la mise en œuvre d'un traitement médicamenteux approprié et de l'instauration de mesures permettant de 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 de diagnostic 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 liquides et solides.²

Pour tester la sensibilité du *Mycobacterium tuberculosis*, le VersaTREK/ESP Culture System II associe un milieu de culture liquide (bouillon VersaTREK Myco), un supplément de croissance (VersaTREK Myco GS), et des antibiotiques spécifiques à un système de détection qui incube automatiquement et contrôle en continu les flacons de culture ensemencés avec des isolats de *Mycobacterium tuberculosis* provenant de diverses sources. Les éponges placées dans les flacons VersaTREK Myco procurent une matrice de soutien à la croissance et augmentent la surface exposée à l'oxygène de l'espace de tête. La technologie du VersaTREK/ESP Culture System II est fondée sur la détection des modifications de la pression dans l'espace de tête d'un flacon fermé hermétiquement dus à la croissance microbienne. Un algorithme spécial a été développé pour détecter les mycobactéries à croissance très lente.

Avec le VersaTREK/ESP Culture System II, les médicaments antituberculeux peuvent être injectés dans les flacons VersaTREK Myco additionnés de VersaTREK Myco GS et d'isolats spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. Un inoculum de *Mycobacterium tuberculosis*, préparé à partir de colonies ayant poussé sur un milieu solide ou dans un flacon d'ensemencement est ajouté à un flacon de contrôle exempt de médicament, utilisé comme contrôle positif, et aux flacons contenant les concentrations spécifiques de médicament. La présence d'une croissance est automatiquement déterminée par l'instrument, mais la détermination réelle de la sensibilité ou de la résistance est réalisée par une comparaison manuelle entre le flacon de contrôle positif, exempt de médicament, et les flacons contenant les médicaments. Si l'organisme est sensible à un médicament, une absence de croissance microbienne, ou une croissance différée sera détectée. Si l'organisme est résistant à un médicament, la croissance microbienne sera détectée dans un délai spécifique et elle sera graphiquement observée sur l'instrument par la génération d'une courbe de consommation descendante. Les médicaments utilisés dans le système sont les principaux médicaments antituberculeux, la rifampicine, l'isoniazide et l'éthambutol à des concentrations spécifiques. Ces médicaments sont fournis sous forme lyophilisée.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Les tests de sensibilité des spécimens de *Mycobacterium tuberculosis* sont réalisés avec le VersaTREK/ESP Culture System II par ensemencement d'une suspension d'organismes dans les flacons VersaTREK Myco qui ont été additionnés de VersaTREK Myco GS et de l'un des trois principaux médicaments antituberculeux. Un VersaTREK Connector est raccordé à chaque flacon afin de réaliser un système fermé permettant de surveiller en continu le flacon avec l'instrument VersaTREK/ESP. Une membrane hydrophobe placée dans le VersaTREK Connector empêche la formation d'aérosol. Les informations cliniques sont saisies dans l'ordinateur du système et les flacons sont placés dans l'instrument pour incubation à 35 – 37 °C dans des conditions stationnaires. Le VersaTREK/ESP Culture System II détecte la croissance mycobactérienne en contrôlant automatiquement (toutes les 24 minutes) le taux de consommation de l'oxygène dans l'espace de tête du flacon de culture et indique la réponse de la croissance sous la forme d'un signal positif. A 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 d'un médicament est déterminée manuellement.

RÉACTIFS

Le VersaTREK Myco Susceptibility Kit comporte deux flacons de rifampicine et d'isoniazide et trois flacons d'éthambutol sous forme lyophilisée. Chaque flacon doit être réhydraté avec 25 ml d'eau distillée ou désionisée stérile.

FORMULE DE RÉHYDRATATION*

(H2O)	Eau traitée	25 ml
(RIF)	Rifampicine	0,003 % p/v
(SA)	Agent de dissolution	1,25 % p/v
(H2O)	Eau traitée	25 ml
(INH)	Isoniazide	0,0012 % p/v
(SA)	Agent de dissolution	1,25 % p/v

(H2O)	Eau traitée	25 ml
(EMB)	Ethambutol	0,024 % p/v
(SA)	Agent de dissolution	1,25 % p/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. Pour travailler avec *M. tuberculosis* en culture, on recommande la pratique du niveau 3 de biosécurité, équipement de conteneur et autres dispositifs.^{3,4,5}
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.

Suivre les règles professionnelles de traitement et d'élimination des matériels contaminés par le sang. (Ne pas manipuler d'une manière « décontractée ». Stériliser avant d'éliminer. Eliminer 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.

REMARQUE : l'ensemencement peut être réalisé en ouvrant les flacons et en ajoutant l'échantillon au moyen de pipettes stériles.

8. Passer tous les flacons VersaTREK Myco dans l'autoclave avant de les éliminer.

ENTREPOSAGE

VersaTREK Myco Susceptibility Kit : 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 Susceptibility Kit	7115-60
VersaTREK Connectors	7150-44

Matériels requis mais non fournis :

Eau distillée ou désionisée stérile
 Middlebrook 7H10 ou autre gélose mycobactérienne ou milieu à base d'œuf
 Autoclave
 Incubateur à CO₂, 37°C
 Anses stériles
 Seringues à tuberculine stériles avec aiguilles serties.
 Pipettes stériles ou pipette automatique avec embouts stériles (en option)
 Désinfectant mycobactéricide (par exemple Amphyl™, OMNI™, etc.)
 Tampons imprégnés d'alcool
 Mélangeur de type vortex
 Enceinte de sécurité biologique
 Microscope
 Matériels de coloration des lames porte-objets
 Organismes de Contrôle Qualité : *M. tuberculosis* ATCC® 25618, *M. tuberculosis* ATCC 35838, *M. tuberculosis* ATCC 35822 et *M. tuberculosis* ATCC 35837

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

1. Réhydratez les médicaments lyophilisés en ajoutant, de manière aseptique, 25 ml d'eau distillée ou désionisée stérile à chaque flacon de médicament. Des concentrations de médicament supplémentaires doivent être préparées pour les flacons d'isoniazide et d'éthambutol comme indiqué dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Préparation d'un médicament antituberculeux

Médicament et concentration finale dans les flacons Myco	Quantité de diluant ajoutée aux flacons lyophilisés	Concentration après réhydratation	Dilutions supplémentaires	Concentration à injecter dans les flacons de test	Nombre de tests/flacons	Nombre de tests/kit
Rifampicine 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ml	Non	30 µg/ml	50	100
Isoniazide 0,4 µg/ml Isoniazide 0,1 µg/ml	25 ml	12 µg/ml	Non 5 ml de médicament dilué plus 15 ml d'eau	12 µg/ml 3 µg/ml	40 40	80 80
Ethambutol 8 µg/ml Ethambutol 5 µg/ml	25 ml	240 µg/ml	Non 10 ml de médicament dilué plus 6 ml d'eau	240 µg/ml 150 µg/ml	30 32	90 96

REMARQUE : Il y a un volume suffisant pour réaliser 80 tests par kit. Les dilutions indiquées ci-dessus fournissent un excès de certains des médicaments pour certaines concentrations. Éliminez les quantités en excès et ne mélangez pas les composants de ce kit avec d'autres numéros de lot provenant d'autres kits.

2. L'inoculum d'un échantillon pour les tests de sensibilité peut provenir de deux sources différentes. Avant de mettre en œuvre un test de sensibilité sur un isolat quelconque, une détermination doit être réalisée pour savoir si l'isolat est constitué de *Mycobacterium tuberculosis* et s'il est à état pur (exempt de contamination) :

a. Suspension cellulaire équivalente au standard McFarland - les isolats croissant dans un milieu gélosé mycobactérien approprié (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen) sont raclés en utilisant des anses stériles puis placés dans un tube contenant environ 9 à 10 ml d'eau distillée ou désionisée stérile et des billes de verre. Le tube est bouché, agité au vortex puis laissé au repos pendant 15 minutes. Environ 5 ml de surnageant sont prélevés, placés dans un tube stérile puis ajustés de façon à équivaloir au standard McFarland n° 1 (environ $3,0 \times 10^7$ CFU/ml) à l'aide d'eau distillée ou désionisée stérile. Une dilution au 1:10 de l'échantillon ajusté est préparée à l'aide d'eau distillée ou désionisée stérile. Pour l'inoculum final, l'organisme est dilué au 1:10.

b. Flacon d'ensemencement VersaTREK Myco - préparé de façon à équivaloir au standard McFarland n° 1.0 créé à partir d'une gélose ou d'une source liquide (croissance dans Middlebrook 7H9) de l'isolat du test. Injectez de manière aseptique 0,5 ml de cette dilution 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 incubé dans l'instrument jusqu'à ce qu'un signal positif soit observé (environ 10^6 CFU/ml). Quand le signal positif a été observé, le VersaTREK Connector est retiré et le flacon est agité pendant 1-2 minutes. L'inoculum du flacon d'ensemencement doit être utilisé dans les 72 heures à partir de l'observation du signal positif de l'instrument. Diluez le flacon d'ensemencement au 1:10.

3. Étiquetez chaque flacon de culture VersaTREK Myco avec une Identification du Patient ou un Identification de Contrôle Qualité. Pour le test de sensibilité Myco, 6 flacons devront être utilisés par isolat.

4. Désinfectez les bouchons des flacons de culture avec de l'alcool et ajoutez de manière aseptique les composants suivants dans chaque flacon de culture en les injectant au travers du septum à l'aide d'une seringue à aiguille sertie comme indiqué dans le Tableau 2. REMARQUE : Sinon, ces ajouts peuvent être réalisés en ouvrant les flacons, en ajoutant les réactifs et l'échantillon à l'aide de pipettes stériles. Prendre soin de conserver l'aseptie de la technique. Le bouchon doit être remis correctement en place pour garantir la fermeture hermétique du système. Si le bouchon et la capsule ne sont pas correctement remis en place, une fuite risque de se produire au niveau du flacon.

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 4 exemple 2.

Les flacons qui donnent un signal positif doivent faire l'objet d'une coloration AFB (Bacilles acido-alcoolo résistants) et les plaques de la préparation d'inoculum initial qui a été repiquée sur une plaque de gélose de Middlebrook 7H10 ou 7H11 devraient être observées pour détecter une croissance à cet instant et pendant 4 semaines. Si des organismes non-afb sont présents sur les frottis, un repiquage vers une plaque non-sélective (par exemple BAP) doit être réalisé et incubé au moins pendant 18 heures dans un incubateur conventionnel à 35°C pour vérifier la pureté de l'isolat. S'il faut répéter les tests, le repiquage de l'inoculum d'origine peut être utilisé pour la vérification de la pureté. Les observations du test qui déterminent sa validité sont présentées dans le Tableau 3. Un exemple de résultats de détermination de la sensibilité est présenté dans le Tableau 4.

TABLEAU 3: 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*	>10 jours à partir de l'inoculation	Pas d'organismes viables, inoculum trop léger	REPETER TEST
Contrôle de croissance	Croissance détectée entre 3 et 10 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

* Le délai de détection supérieur à 10 jours pour le contrôle de croissance a été établi à partir de données cliniques et internes.

Assurez-vous de contrôler les résultats du repiquage sur la gélose mycobactérienne afin de vérifier que seule une espèce de mycobactérie est présente, en particulier dans le cas d'un résultat résistant.

Examinez TOUJOURS le graphique de l'isolat pour déterminer le délai de détection avant de faire le rapport. Si les graphiques des tests qui ont indiqué un résultat positif semblent anormaux, contactez l'assistance technique de TREK au 1.216.351.8735.

Tableau 4 : Exemples de résultats pour le calcul de la sensibilité des souches de *M. tuberculosis* aux antibiotiques du VersaTREK Myco Susceptibility Kit

Exemple 1

Médicament/ Conc. (µg/ml)	Rifampine	Isoniazid		Ethambutol	
		1	0,1	0,4	5
Témoin positif	2				
Jour positif	4	5	7	5	Pas de croissance
Résultat	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée				

Exemple 2

Médicament/ Conc. (µg/ml)	Rifampine	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Témoïn positif	5				
Jour positif	3	7	9	9	Pas de croissance
Résultat	Résistant	Résistant	Susceptible	Susceptible	Susceptible

Exemple 3

Médicament/ Conc. (µg/ml)	Rifampine	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Témoïn positif	7				
Jour positif	8	11	Pas de croissance	10	Pas de croissance
Résultat	Résistant	Résistant	Susceptible	Résistant	Susceptible

Exemple 4

Médicament/ Conc. (µg/ml)	Rifampine	Isoniazid		Ethambutol	
	1	0,1	0,4	5	8
Témoïn positif	11				
Jour positif	9	11	Pas de croissance	10	Pas de croissance
Résultat	Contrôle de la croissance invalide, Analyse répétée				

LIMITATIONS

1. La capacité du VersaTREK/ESP Culture System II à détecter une résistance à de faibles concentrations d'éthambutol avec *Mycobacterium tuberculosis* est inconnue car des tests à la concentration de 5 µg/ml n'ont pas été faits pendant l'évaluation du test sur les sites cliniques.

2. Le VersaTREK Myco Susceptibility Kit ne doit pas être utilisé avec des isolats directement obtenus depuis un flacon échantillon positif (flacon principal).

VALEURS DE REFERENCE

La sensibilité de 109 souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* a été testée vis-à-vis de la rifampicine (RIF), de l'éthambutol (ETH) et de l'isoniazide (INH) sur 4 différents sites en utilisant la Méthode des proportions sur gélose modifiée (MAP)⁷ et le système de test de sensibilité VersaTREK Myco. Les deux méthodes ont détecté 87 (79,8%) souches entièrement sensibles. La méthode MAP a détecté 11 souches (10,1%) mono-résistantes à l'INH, 9 souches (8,2%) résistant à plusieurs médicaments (MDR), et 2 souches (1,8%) qui étaient résistantes aux trois médicaments. Une souche était résistante à l'INH et à l'ETH. Le VersaTREK/ESP Culture System II a détecté 11 souches mono-résistantes à l'INH (10,1%) et 1 à la RIF (0,9%), 8 (7,3%) souches MDR, une souche résistante à l'INH et à l'ETH, et deux souches (1,8%) qui étaient résistantes aux trois médicaments testés. Selon le Projet Global de WHO/IUALTD relatif à la Surveillance de la résistance vis-à-vis des médicaments antituberculeux⁸, les profils de résistance les plus communs aux États-Unis sont la mono-résistance à l'isoniazide (INH) et à la streptomycine (STR), suivi des profils de résistance à plusieurs médicaments (MDR). Dans le rapport de surveillance, 87,1% des souches testées étaient sensibles. Le pourcentage des résistances à plusieurs médicaments était de 4,5%, dont 2% étaient MDR. Ces données sont en accord avec les résultats de l'étude réalisée avec le VersaTREK.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Tous les nouveaux VersaTREK Myco Susceptibility Kit doivent être testés avec les isolats de contrôle qualité figurant dans le Tableau 5 avant le test du patient. Les souches de contrôle qualité doivent être testées de la même manière que les isolats cliniques selon la procédure "Ensemencement des flacons de culture VersaTREK Myco pour les tests de sensibilité Myco." Les résultats doivent être lus de la manière recommandée dans la section Résultats de cette notice. Le tableau suivant fournit les valeurs de référence pour les souches de contrôle qualité recommandées. Si les valeurs de référence ne sont pas atteintes, ne réalisez ni rapportez de résultats du patient en utilisant ces lots. Contactez l'assistance technique de TREK au 1.216.351.8735.

Tableau 5 : Souches de Contrôle Qualité et Valeurs de référence

Organisme	ATCC	Rifampicine	Isoniazide	Ethambutol
<i>M. tuberculosis</i>	25618	Sensible	Sensible	Sensible
<i>M. tuberculosis</i>	35838	Résistant	–	–
<i>M. tuberculosis</i>	35822	–	Résistant	–
<i>M. tuberculosis</i>	35837	–	–	Résistant

CARACTÉRISTIQUES

Une comparaison entre VersaTREK/ESP Culture System II et la Méthode des proportions sur gélose⁷ a été réalisée sur un total de 109 souches cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* provenant de quatre sites de test. Les sites de test comprennent un hôpital urbain avec de grandes populations de patients porteurs du VIH et un grand volume de test de mycobactéries, deux hôpitaux nationaux centraux pour les patients porteurs de la TB avec un grand nombre de cultures de patients et un grand hôpital universitaire. Le test a été réalisé en utilisant trois des médicaments principaux pour le test de la sensibilité de *M. tuberculosis* : rifampicine, isoniazide et éthambutol. Aussi bien la méthode de bouillon VersaTREK Myco ensemencé que la méthode standard de McFarland pour la préparation de l'ensemencement ont été évaluées avec des résultats similaires ; un seul ensemble de données est donc présenté. Les données de deux souches ont été éliminées en raison d'une contamination ; une souche pour le VersaTREK/ESP Culture System II et une pour la méthode des proportions sur gélose. Le test a été réalisé sur une concentration de rifampicine et sur deux concentrations d'isoniazide et d'éthambutol. Le Tableau 6 présente la relation et les intervalles de confiance à 95% (CI) des résultats des tests avec le VersaTREK/ESP Culture System II et avec les proportions sur gélose.

Tableau 6 : Résultats de l'étude clinique obtenus avec le VersaTREK/ESP Culture System II comparés à ceux obtenus avec la méthode des proportions sur gélose

Médicament	Méthode des proportions sur gélose			VersaTREK/ESP Culture System II				
	Concentration	# S	# R	Concentration équivalente	Souches sensibles		Souches résistantes	
					#En accord	% d'accord (IC à 95 %)	# d'accord	% d'accord (IC à 95 %)
Rifampicine	1 µg/ml	99	10	1 µg/ml	99	100 (96-100)	10	100 (69-100)
Isoniazide	0,2 µg/ml	85	24	0,1 µg/ml	85	100 (96-100)	23	95,8 (52-100)
	1 µg/ml	94	15	0,4 µg/ml	94	100 (96-100)	15	100 (79-99)
Ethambutol	5 µg/ml	104	4	5 µg/ml	NT		NT*	
	10 µg/ml	105	3	8 µg/ml	105	100 (96-100)	3	100 (29-100)

* La répétition du test en utilisant le VersaTREK/ESP Culture System II pour l'éthambutol à 5 µg/ml a donné un résultat résistant pour le seul isolat sensible à 10 µg/ml mais résistant à 5 µg/ml quand il a été testé avec la méthode des proportions sur gélose. NT = Non Testé

INFORMATIONS SUR LES DANGERS

Rifampicine

- Xn Nocif
- R22 Nocif en cas d'ingestion.
- S26 En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment à l'eau puis consulter un médecin.
- S36/39 Porter un vêtement de protection approprié et un appareil de protection des yeux / du visage.

Isoniazide

- 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.

Ethambutol

- Xn Nocif
- R22 Nocif en cas d'ingestion.
- S20 Ne pas manger ou boire lors de son utilisation.
- S24/25 Éviter le contact avec la peau et les yeux.
- S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette si possible).

RÉFÉRENCES: Page 8

Pour obtenir de plus amples informations, contactez l'assistance technique de TREK au 1.800.642.7029. Fora dos E.U., chamada 1.216.351.8735.

KIT VersaTREK® MYCO SUSCEPTIBILITY, 7115-60

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O objectivo do Kit VersaTREK Myco Susceptibility é testar a sensibilidade qualitativa *in vitro* de colónias isoladas do *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina, etambutol e isoniazida no Aparelho VersaTREK ou ESP Culture System II. Inóculos de origens apropriadas são preparados para o crescimento em gelose sólida, como as geloses inclinadas Middlebrook 7H10 ou Lowenstein-Jensen ou o caldo Middlebrook 7H9.

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 do 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 de *Mycobacterium tuberculosis*, o VersaTREK/ESP Culture System II combina um meio de cultura líquido (caldo VersaTREK Myco), um suplemento de crescimento (VersaTREK Myco GS) e antibióticos específicos, com um sistema de detecção que incuba automaticamente e monitoriza continuamente as garrafas de cultura inoculadas com isolados de *Mycobacterium 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 VersaTREK/ESP Culture System II 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 VersaTREK/ESP Culture System II, os antibióticos anti-tuberculose podem ser injectados nas garrafas VersaTREK Myco suplementadas com VersaTREK Myco GS e isolados específicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Um inóculo de uma cultura confirmada de *Mycobacterium tuberculosis*, preparado a partir de colónias em meios sólidos ou de uma garrafa de disseminação, é adicionado a uma garrafa de controlo isenta de antibiótico, utilizado como controlo positivo e frascos que contenham concentrações específicas de um antibiótico. A detecção de crescimento é determinada automaticamente pelo aparelho, mas a determinação actual de sensibilidade ou de resistência é efectuada por uma comparação manual da garrafa de controlo positivo isenta de antibióticos com as garrafas que contenham antibióticos. Se o microrganismo for sensível a um antibiótico, não será detectado crescimento microbiológico ou será detectado crescimento retardado. Se o microrganismo for resistente ao antibiótico, o crescimento microbiológico será detectado dentro de um período específico, sendo graficamente observado no aparelho através da geração de uma curva de consumo descendente. Os antibióticos utilizados neste sistema são os antibióticos principais rifampicina, isoniazida e etambutol, em concentrações específicas. Estes antibióticos são fornecidos sob forma liofilizada.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste de sensibilidade das amostras de *Mycobacterium tuberculosis* é efectuado com o VersaTREK/ESP Culture System II através da inoculação de uma suspensão de microrganismos nas garrafas VersaTREK Myco suplementadas com o VersaTREK Myco GS e com um destes três antibióticos principais. Um VersaTREK Connector é fixado a cada garrafa, de forma a estabelecer um sistema fechado para monitorização da garrafa com o aparelho VersaTREK/ESP. Uma membrana hidrofóbica no VersaTREK Connector evita a produção de aerossóis. A informação clínica é introduzida no computador do sistema e as garrafas são colocadas no aparelho para incubação a 35 – 37 °C, em condições estáveis. O VersaTREK/ESP Culture System II 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 Susceptibility contém dois frascos com rifampicina e isoniazida e três frascos de etambutol sob a forma liofilizada. Cada frasco deve ser re-hidratado com 25 ml de água esterilizada destilada ou desionizada.

FÓRMULA NA RE-HIDRATAÇÃO*

(H2O)	Água processada	25 ml
(RIF)	Rifampicina	0,003% peso/volume
(SA)	Agente de Solubilização	1,25 % peso/volume
(H2O)	Água processada	25 ml
(INH)	Isoniazida	0,0012% peso/volume
(SA)	Agente de Solubilização	1,25% peso/volume

(H2O)	Água processada	25 ml
(EMB)	Etambutol	0,024% 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. Consultar 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 Biossegurança.^{3, 4, 5}
 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 contaminados com sangue. (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 utilizar garrafas que se apresentem turvas ou com fissuras.
 7. Utilize apenas seringas com bloqueio de agulha, se utilizar este método de inoculação.
NOTA: A inoculação pode ser efectuada abrindo as garrafas e adicionando a amostra, utilizando pipetas esterilizadas.
 8. Proceda à autoclavagem de todas as garrafas VersaTREK Myco antes da eliminação.

ARMAZENAMENTO

Kit VersaTREK Myco Susceptibility: Armazenamento entre 2° e 8°C. Proteger da exposição solar. Depois de rehidratado, armazenar entre 2° e 8°C, utilizar dentro de 4 semanas ou congelar a -20°C e utilizar no prazo máximo de 3 meses. Depois de descongelado, não voltar a congelar.

PROCEDIMENTO: TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE 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 Susceptibility	7115-60
VersaTREK Connectors	7150-44

Materiais Necessários mas Não Fornecidos:

Água esterilizada destilada ou desionizada
 Middlebrook 7H10 ou outro meio micobacteriano com base de agar e ovo
 Autoclave
 Incubador de CO₂, 37°C
 Placas de Petri esterilizadas
 Seringas de tuberculina esterilizadas com agulhas fixas permanentes
 Pipetas Esterilizadas ou Dispositivo de Pipetagem com Ponteiras de Pipeta Esterilizadas (opcional)
 Desinfectante Micobactericida (p. ex. Amphyl™, OMNI™, etc.)
 Tampões de álcool
 Misturador vórtex
 Câmara de fluxo laminar
 Microscópio
 Materiais para lâminas de coloração
 Microrganismos de Controlo de Qualidade: *M. tuberculosis* ATCC® 25618, *M. tuberculosis* ATCC 35838, *M. tuberculosis* ATCC 35822 e *M. tuberculosis* ATCC 35837

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

1. Re-hidratar os antibióticos liofilizados adicionando de forma asséptica 25 ml de água esterilizada destilada ou desionizada a cada frasco de antibiótico. Devem ser efectuadas concentrações de antibiótico adicionais para os frascos de isoniazida e etambutol, como indicado na Tabela 1.

Tabela 1: Preparação de Medicamento Anti-Tuberculose

Antibiótico e Concentração Final nos Frascos Myco	Quantidade de Diluente Adicionado a Frascos Liofilizados	Concentração após Re-hidratação	Diluições Adicionais	Concentração a Injectar nos Frascos de Teste	Número de Testes/Garrafa	Número de Testes/Kit
Rifampicina 1 µg/ml	25 ml	30 µg/ml	Não	30 µg/ml	50	100
Isoniazida 0,4 µg/ml Isoniazida 0,1 µg/ml	25 ml	12 µg/ml	Não 5 ml antibiótico diluído mais 15 ml de água	12 µg/ml 3 µg/ml	40 40	80 80
Etambutol 8 µg/ml Etambutol 5 µg/ml	25 ml	240 µg/ml	Não 10 ml antibiótico diluído mais 6 ml de água	240 µg/ml 150 µg/ml	30 32	90 96

NOTA: Existe volume suficiente para efectuar 80 testes por kit. As diluições acima oferecem um excesso de alguns antibióticos em algumas concentrações. Eliminar as quantidades em excesso e não misturar componentes deste kit com diferentes números de lote de outros kits.

2. O inóculo de uma amostra para teste de sensibilidade pode ter duas origens. Antes de iniciar um teste de sensibilidade de qualquer isolado, deve determinar-se se o isolado é *Mycobacterium tuberculosis* e se está em estado puro (isento de contaminantes):

a. Suspensão celular equivalente a McFarland – Passar algumas colónias cultivadas num meio de gelose micobacteriana apropriada (Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H11, Lowenstein-Jensen) para uma placa de Petri esterilizada e para um tubo que contém aproximadamente 9 a 10 ml de água esterilizada destilada ou desionizada e contas de vidro. Tapar e agitar o tubo e depois deixar repousar durante 15 minutos. Remover aproximadamente 5 ml da camada superior, colocar um tubo de ensaio esterilizado e ajustar para 1 de McFarland ou equivalente (aproximadamente $3,0 \times 10^7$ CFU/ml) utilizando água esterilizada destilada ou desionizada. Uma diluição de 1:10 da amostra ajustada é preparada utilizando água esterilizada destilada ou desionizada. Para o inóculo final, o microrganismo é diluído 1:10.

b. Garrafa de Disseminação VersaTREK Myco - Preparar uma suspensão equivalente a 1.0 McFarland a partir do meio líquido ou de gelose (cultivada em Middlebrook 7H9) do isolado de teste. Injectar de forma asséptica 0,5 ml desta diluição numa garrafa de cultura VersaTREK Myco suplementada com 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. Um VersaTREK Connector esterilizado é colocado na garrafa e a garrafa é incubada no aparelho até ser observado um sinal positivo (aprox. 10^6 CFU/ml). Depois de atingido um sinal positivo, o VersaTREK Connector é removido e a garrafa agitada durante 1 a 2 minutos. O inóculo da garrafa de disseminação deve ser utilizado dentro de 72 horas do sinal de aparelho positivo. Diluir a garrafa de disseminação a 1:10.

3. Identificar com uma etiqueta cada garrafa de cultura VersaTREK Myco com a Identificação do Doente ou identificador de CQ. Para o teste de Sensibilidade Myco, são utilizadas 6 garrafas por isolado.

4. Desinfectar as tampas da garrafa de cultura com álcool e adicionar de forma asséptica os seguintes componentes em cada garrafa de cultura, atravessando o septo com uma agulha e seringa de bloqueio, tal como descrito na Tabela 2. NOTA: Alternativamente, estas adições podem ser efectuadas abrindo as garrafas e adicionando os reagentes e a amostra, utilizando pipetas esterilizadas. Deve ter-se o cuidado de manter uma técnica asséptica. A tampa e cápsula devem ser devidamente encaixadas, de forma a garantir um sistema estanque. Se a tampa e a cápsula não forem encaixadas devidamente, irá ocorrer um erro de garrafa com fuga.

Tabela 2: Adições de Inóculo e Reagente ao Procedimento de Teste

Identificar com etiqueta a Garrafa Myco com a concentração final e o n.º de identificação do doente	Volume de GS diluído a adicionar	Volume de antibiótico diluído preparado na Tabela 1 a adicionar	Diluição de 1:10 de inóculo preparado a partir de qualquer origem
1 µg/ml de Rifampicina	1 ml	0,5 ml de Rifampicina a 30µg/ml	0,5 ml
0.4 µg/ml de Isoniazida	1 ml	0,5 ml de Isoniazida a 12 µg/ml	0,5 ml
0.1 µg/ml de Isoniazida	1 ml	0,5 ml de Isoniazida a 3 µg/ml	0,5 ml
8 µg/ml de Etambutol	1 ml	0,5 ml de Etambutol a 240 µg/ml	0,5 ml
5 µg/ml de Etambutol	1 ml	0,5 ml de Etambutol a 150 µg/ml	0,5 ml
Controlo	1 ml	0,5 ml de água esterilizada destilada ou desionizada	0,5 ml

5. Efectuar uma verificação de pureza no inóculo de *Mycobacterium tuberculosis* através da subcultura de suspensão de microrganismos numa placa Middlebrook 7H11 ou 7H10 e num meio sólido mais facultativo que suporte o crescimento de bactérias, como a Gelose de Sangue (BAP). Incubar a BAP durante pelo menos 18 horas numa incubadora convencional e a agar Middlebrook durante 4 semanas a 37°C.

6. Limpar as garrafas de cultura e as tampas com desinfetante micobactericida.

7. Homogeneizar todas as garrafas invertendo várias vezes.

8. Remover o selo do fundo de um VersaTREK Connector. Premir a extremidade da agulha do VersaTREK Connector contra a tampa da garrafa de cultura. NOTA: Não inverter a garrafa de cultura enquanto o VersaTREK Connector está na garrafa. O fluido na agulha pode interferir com as leituras de pressão da garrafa.

9. Identificar com etiqueta cada garrafa VersaTREK Myco com a Identificação do Doente, Identificação e concentração do Antibiótico. O formato recomendado para o número de acesso é "Acesso" XY, em que "Acesso" é o número de acesso para um teste de sensibilidade de um isolado em particular, X é o identificador de antibiótico e Y é a concentração de antibiótico. Esta estratégia de etiquetagem irá permitir ao utilizador obter os resultados de teste de cada grupo isolado de garrafas. Pode utilizar a porção "Acesso" do número para procurar e visualizar os resultados de teste. Consultar o Manual do Utilizador do VersaTREK/ESP Culture System II para detalhes sobre a introdução de garrafas.

Exemplo: Controlo Número de Acesso = 1234C
 Rifampicina 1,0 µg/ml Número de Acesso = 1234R1
 Isoniazida 0,4 µg/ml Número de Acesso = 1234I0.4

10. Colocar a garrafa de cultura com o VersaTREK Connector no aparelho.

11. A detecção de crescimento é determinada pelo aparelho e o tempo de detecção pode ser obtido pela revisão do gráfico de resultados de teste. O teste deve ser concluído em 13 dias ou menos com base na garrafa de controlo isento de antibióticos.

RESULTADOS

Para o teste de sensibilidade utilizando o VersaTREK/ESP Culture System II, um isolado é interpretado como sendo sensível ou resistente a um antibiótico com base no seguinte (arredondar todos os tempos de detecção para o dia inteiro mais próximo):

1. Depois de a garrafa isenta de antibióticos se ter tornado positiva, registar o tempo de detecção (indicado no gráfico da garrafa de teste).

2. Pesquisar e registar os resultados das outras garrafas de teste para o isolado, três dias adicionais de incubação depois do controlo de isenção de antibióticos ter assinalado positivo.

3. **Sensível:** Um isolado numa garrafa que contenha antibiótico que não dê sinal, dentro do período de detecção de três dias de controlo de isenção de antibióticos, é determinado sensível à concentração de antibióticos. O crescimento três dias, arredondados para o número inteiro mais próximo, após a garrafa de controlo de crescimento ter dado positiva não deve ser tido em conta como indicação de resistência. 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.

4. **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:

- Nenhum 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 4, exemplo 2.

As garrafas que assinalem positivo devem ser marcados com AFB (Acid Fast Bacilli) e as placas da preparação de inóculo inicial que tiveram uma subcultura de placa de agar 7H10 ou 7H11 Middlebrook devem ser observadas quanto ao crescimento neste período e durante 4 semanas. Se surgirem microrganismos não AFB, uma subcultura numa placa não selectiva (p. ex. BAP) deve ser efectuada e incubada durante pelo menos 18 horas, numa incubadora convencional a 35°C, para verificar a pureza do isolado. Se necessário repetir o teste, pode ser utilizada a subcultura do inóculo original para verificação da pureza. As observações de teste que determinam a validade do teste são apresentadas na Tabela 3. Um exemplo de resultados para determinação da sensibilidade é apresentado na Tabela 4.

TABELA 3: 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*	>10 dias da inoculação	Microrganismo não viável, inóculo demasiado leve	REPETIR TESTE
Controlo de crescimento	Crescimento detectado entre 3 e 10 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 10 dias de tempo de detecção para o controlo de crescimento foi estabelecido por dados internos e clínicos.

Assegurar-se de que verifica os resultados da subcultura na gelose micobacteriana para verificar se apenas uma espécie de micobactéria esteve presente, especialmente no caso de um resultado resistente.

Rever SEMPRE o gráfico de isolado para determinar o tempo de detecção antes do relatório. Se os gráficos para testes que tiverem assinalado positivo não parecem normais, contactar o Apoio Técnico da TREK através do 1.216.351.8735.

Tabela 4: Exemplos de Resultados para Cálculo de Susceptibilidade de Estirpes de *M. tuberculosis* para os Antibióticos do Kit VersaTREK Myco Susceptibility

Exemplo 1

Medicamento/ Conc. (µg/ml)	Rifampicina	Isoniazida		Etambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Controlo Positivo	2				
Positivo Dia	4	5	7	5	Sem Crescimento
Resultado	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio				

Exemplo 2

Medicamento/ Conc. (µg/ml)	Rifampicina	Isoniazida		Etambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Controlo Positivo	5				
Positivo Dia	3	7	9	9	Sem Crescimento
Resultado	Resistente	Resistente	Susceptível	Susceptível	Susceptível

Exemplo 3

Medicamento/ Conc. (µg/ml)	Rifampicina	Isoniazida		Etambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Controlo Positivo	7				
Positivo Dia	8	11	Sem Crescimento	10	Sem Crescimento
Resultado	Resistente	Resistente	Susceptível	Resistente	Susceptível

Exemplo 4

Medicamento/ Conc. (µg/ml)	Rifampicina	Isoniazida		Etambutol	
	1	0.1	0.4	5	8
Controlo Positivo	11				
Positivo Dia	9	11	Sem Crescimento	10	Sem Crescimento
Resultado	Controlo do crescimento inválido, repetir ensaio				

LIMITAÇÕES

1. A capacidade do VersaTREK/ESP Culture System II detectar resistência a baixas concentrações de Etambutol com *Mycobacterium tuberculosis* é desconhecida, porque o teste à concentração de 5 µg/ml não foi efectuado durante a avaliação de teste nos locais clínicos.
2. O Kit VersaTREK Myco Susceptibility não deve ser utilizado com isolados obtidos directamente de uma garrafa de amostra positiva (Garrafa Principal).

RESULTADOS ESPERADOS

109 estirpes clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* foram testadas quanto à sensibilidade de Rifampicina (RIF), Etambutol (ETH) e Isoniazida (INH) em 4 locais diferentes, utilizando o Método Proporções Agar Modificado (MAP)⁷ e o Sistema de Teste VersaTREK Myco Susceptibility. Ambos os métodos detectaram 87 (79,8%) estirpes pan-sensíveis. O método MAP detectou 11 estirpes mono-resistentes a INH (10,1%), 9 estirpes Multi-resistentes aos antibióticos (MDR) (8,2%) e 2 estirpes (1,8%) resistentes aos três antibióticos. Uma estirpe foi resistente a INH e ETH. O VersaTREK/ESP Culture System II detectou 11 estirpes mono-resistentes a INH (10,1%) e 1 a RIF (0,9%), 8 estirpes MDR (7,3%), uma estirpe resistente a INH e ETH e duas estirpes (1,8%) resistentes aos três medicamentos testados. De acordo com o Projecto Global sobre Controlo de Resistência aos Medicamentos Anti-Tuberculose⁶ da OMS/IUALTD, os padrões de resistência mais comuns nos EUA são mono-resistentes a Isoniazida (INH) e Streptomina (STR), seguidos dos Multi-resistentes aos antibióticos (MDR). No relatório de controlo, 87,1% das estirpes testadas foram sensíveis. A percentagem de resistência a múltiplos antibióticos foi de 4,5%, dos quais 2% foram MDR. Estes dados estão de acordo com os resultados de estudos reportados pela VersaTREK.

CONTROLO DE QUALIDADE

Cada novo Kit VersaTREK Myco Susceptibility devem ser testados com os isolados de controlo de qualidade listados na Tabela 5 antes do teste de doentes. As estirpes de controlo de qualidade devem ser testadas tal como os isolados clínicos no procedimento para "Inoculação de Garrafas de Cultura VersaTREK Myco para Teste de Sensibilidade Myco." Os resultados devem ser lidos como recomendado na secção Resultados deste anexo da embalagem. O seguinte mapa apresenta os resultados esperados para as estirpes de controlo de qualidade recomendadas. Se os resultados esperados não forem obtidos, não execute nem reporte resultados de doentes utilizando estes lotes. Contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1.216.351.8735.

Tabela 5: Estirpes QC e Resultados Esperados

Organismo	ATCC	Rifampicina	Isoniazida	Etambutol
<i>M. tuberculosis</i>	25618	Susceptível	Susceptível	Susceptível
<i>M. tuberculosis</i>	35838	Resistente	–	–
<i>M. tuberculosis</i>	35822	–	Resistente	–
<i>M. tuberculosis</i>	35837	–	–	Resistente

CARACTERÍSTICAS DE COMPORTAMENTO FUNCIONAL

Uma comparação entre o VersaTREK/ESP Culture System II e o Método Proporções Agar⁷ foi efectuada com um total de 109 estirpes clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* de quatro locais de teste. Os locais de teste incluíram um hospital urbano com ampla população de doentes com VIH e elevado volume de teste de Micobactéria, dois hospitais nacionais de consulta de tuberculose com elevado volume de culturas de referência e um grande hospital universitário. O teste foi efectuado utilizando três dos principais antibióticos para teste de sensibilidade de *M. tuberculosis*: Rifampicina, Isoniazida e Etambutol. Tanto a disseminação de caldo VersaTREK Myco como os métodos padrão McFarland de preparação de inoculação foram avaliados com resultados similares; por isso, apenas um conjunto de dados é apresentado. Os dados de duas estirpes foram eliminados devido a contaminação; uma estirpe de VersaTREK/ESP Culture System II e uma do Método Proporções Agar. O teste foi efectuado numa concentração de Rifampicina e duas concentrações de Isoniazida e Etambutol. A Tabela 6 apresenta uma concordância de 95% dos intervalos de confiança (CI) do VersaTREK/ESP Culture System II com os resultados de teste proporções agar.

**Tabela 6: Resultados do Estudo Clínico com o VersaTREK/ESP Culture System II
Comparação com o Método Proporções Agar**

Antibiótico	Método Proporções Agar			VersaTREK/ESP Culture System II				
	Concentração	N.º S	N.º R	Concentração Equivalente	Estirpes Sensíveis		Estirpes Resistentes	
					N.º de Concordância	% de Concordância (95% CI)	N.º de Concordância	% de Concordância (95% CI)
Rifampicina	1 µg/ml	99	10	1 µg/ml	99	100 (96-100)	10	100 (69-100)
Isoniazida	0.2 µg/ml 1 µg/ml	85 94	24 15	0.1 µg/ml 0.4 µg/ml	85 94	100 (96-100) 100 (96-100)	23 15	95.8 (52-100) 100 (79-99)
Etambutol	5 µg/ml 10 µg/ml	104 105	4 3	5 µg/ml* 8 µg/ml	NT 105	100 (96-100)	NT* 3	100 (29-100)

* A repetição do teste utilizando o VersaTREK/ESP Culture System II para Etambutol a 5 µg/ml deu um resultado de resistência para o isolado que foi sensível a 10 µg/ml mas resistente a 5 µg/ml quando testado com o Método de Proporções de Gelose.

NT = Não Testado

INFORMAÇÃO DE RISCO

Rifampicina

Xn Nocivo

R22 Nocivo por ingestão.

S26 Em caso de contacto com os olhos, lave imediata e abundantemente com água e consultar um médico.

S36/39 Usar vestuário de protecção adequado e protecção para os olhos/cara.

Isoniazida

Xn Nocivo

R22 Nocivo por ingestão.

S20 Não comer nem beber durante a utilização.

S36 Use vestuário de protecção adequado.

S46 Em caso de ingestão, consultar imediatamente um médico e mostrar o rótulo ou a embalagem.










Etambutol


Xn Nocivo
R22 Nocivo por ingestão.
S20 Não comer nem beber durante a utilização.
S24/25 Evitar o contacto com a pele e os olhos.
S45 Em caso de acidente ou indisposição, consultar imediatamente um médico (se possível, mostrar-lhe o rótulo).

REFERÊNCIAS: Página 8

Para informações adicionais contacte o Apoio Técnico da TREK através do 1.800.642.7029. Fora dos E.U., chamada 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) aaaammdd/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	
	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	

	GB ES IT FR PT	Keep away from heat Mantener alejado de fuentes de calor Tenere lontano dal calore Conserver à l'abri de la chaleur Manter afastado do calor
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> CONT </div>	GB ES IT FR PT	Contains Contiene Contiene Contient Contém
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> 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; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> (RIF) </div>	GB ES IT FR PT	Rifampin Rifampicina Rifampicina Rifampicine Rifampicina
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> (INH) </div>	GB ES IT FR PT	Isoniazid Isoniacida Isoniazide Isoniazide Isoniazida
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: auto;"> (EMB) </div>	GB ES IT FR PT	Ethambutol Ethambutol Etambutolo Ethambutol Etambutol