

## Revisions

Rev from	Rev to	ECO #
0604	2010/06	5369-10

**Notes:**

1. BD Cat. Number 231604,231605
2. Blank (Sheet) Size : Length: See VS    Width: See VS  
 Number of Pages: See VS    Number of Sheets: 1  
 Page Size: Length 9.875"    Width 4.5"                      Final Folded Size: See VS
3. Style (see illustrations below): # 4



4. VS Controlled By BD Caribe, LTD
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes     No  
 No. of Colors: 1                      PMS# Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	<b>Becton, Dickinson and Company</b> 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA			
Proofer	Date			<b>Category and Description</b>  Package Insert, Sensi-Disc Elution Discs, Anaerobes	Sheet: 1 of 13	A
Checked By	Date				Scale:    N/A	
Part Number: 8800591						

# **BD BBL™ Sensi-Disc™ Elution Discs** for Susceptibility Testing of Anaerobes

Antimicrobial Agent	Code	Conc.
Metronidazole	MET-80	80 µg

English: pages 1 – 3  
Français : pages 3 – 5  
Deutsch: Seiten 5 – 7

Italiano: pagine 7 – 9  
Español: páginas 9 – 11



8800591  
2010/06

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Um Anleitungen zu erhalten, wenden Sie sich bitte an Ihren BD-Kundendienst. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Contattare il rappresentante BD di zona per ottenere il foglietto illustrativo. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіндіңіз жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

## INTENDED USE

**BBL™ Sensi-Disc™** Metronidazole Elution Discs are to be used for determining the *in vitro* susceptibility of anaerobic bacteria to metronidazole by the broth-disc method.

## SUMMARY AND EXPLANATION

In 1959 Schneierson<sup>1</sup> described a method for testing the antibiotic susceptibility of bacteria. In this method a known concentration of antibiotic is impregnated on a paper disc and placed in a tube of broth. The antibiotic concentration approximates the concentration of the antibiotic achievable in the blood. This method was named the "broth-disc method." In 1972 Wilkins and Thiel<sup>2</sup> modified this method for testing anaerobes by placing the discs in a pre-reduced medium. The major advantage of the broth-disc method is that most anaerobic isolates can be tested for antibiotic susceptibility. The major disadvantage is that the degree of susceptibility or resistance cannot be determined. In 1990 the NCCLS no longer listed this method as an approved alternative method for susceptibility testing of anaerobes due to its unreliability and poor correlation with standard methods.

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

A paper disc containing a specific concentration of an antimicrobial is added to a broth medium. The antimicrobial agent is eluted into the broth from the paper disc. The test organism is inoculated into a tube containing the broth medium and the antimicrobial disc and into a control tube containing only the broth medium. After suitable incubation, susceptibility is determined by comparing the amount of growth in the tube with the antimicrobial disc to the amount of growth in the control tube.

## REAGENTS

**Sensi-Disc** brand discs are prepared by impregnating high quality absorbent paper with accurately determined amounts of antimicrobial agents. Discs are clearly marked on both sides with letters and numbers designating the agent and the drug content. **Sensi-Disc** agents are furnished in cartridges containing 50 discs each. The last disc in each cartridge is marked "X" and contains the drug as coded. The cartridges are for use in Single Disc Dispensers.

## Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures. After use, prepared tubes, specimen containers and other contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

In 1990 the NCCLS no longer listed this method as an approved alternative method for susceptibility testing of anaerobes due to its unreliability and poor correlation with standard methods.

**Storage Instructions:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs should be stored in the dark at -20 to +8°C.

**Product Deterioration:** Discard expired discs. Also discard cartridges from which discs have been frequently removed during a week. Discard containers left out overnight in the laboratory, or else test the discs for performance. The expiration date applies to discs in intact container stored as directed. Do not open until ready to use.

## SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Specimens suitable for culture may be handled using various techniques. For detailed information, consult appropriate texts.<sup>3,4</sup> Specimens should be obtained before antimicrobial agents have been administered. Provision must be made for prompt delivery to the laboratory.

## PROCEDURE

**Material Provided:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs.

**Materials Required But Not Provided:** Ancillary culture media, quality control organisms and laboratory equipment as required for this procedure.

## Culture Medium

Thioglycollate Medium without Indicator – 135C, supplemented with 5 µg/mL of hemin before autoclaving, and 0.1 µg/mL of vitamin K<sub>1</sub> and 1 mg/mL of sodium bicarbonate just prior to use. Medium should be dispensed in 5 mL quantities in 13 x 100 mm screw-capped test tubes and autoclaved at 121°C for 15 min.

## Inoculum

The inoculum should be prepared by incubating the organism at 35 to 37°C in Thioglycollate Medium without Indicator – 135C with hemin, vitamin K<sub>1</sub> and sodium bicarbonate until visible turbidity has developed. This culture should then be diluted with a sterile clear broth (boiled and cooled just prior to use) to match a barium sulfate turbidity standard (0.5 McFarland standard).

The barium standard may be prepared by adding 0.5 mL of 0.048M BaCl<sub>2</sub> (1.175% w/v BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O) to 99.5 mL of 0.36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v). The barium sulfate suspension may be distributed into screw-capped tubes that are sealed tightly and stored in the dark at room temperature for future use. This standard barium sulfate suspension must be mixed vigorously immediately prior to use.

## Test Procedure:

1. Set up and label three tubes of reduced medium.
2. Add one **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Disc to each of tubes #2 and #3. Tube #1 serves as a culture control and does not receive a disc. Tube #3 serves as a sterility control for the metronidazole discs.
3. Incubate the tubes at 35 to 37°C for 2 h to permit equilibration of the drug throughout the medium.
4. Inoculate each of tubes #1 and #2 with 0.1 mL of the diluted inoculum as in **Inoculum** section above.
5. Loosen caps and incubate the tubes at 35 to 37°C in an anaerobic atmosphere (e.g., anaerobic glove box, anaerobic jar, etc.).

The length of the incubation period will vary, depending on the rapidity of growth of the test organism and can be determined by the appearance of visible turbidity in tube #1.

**User Quality Control:** Control strains recommended for standardized susceptibility testing. Each time the test is performed, the following strains should be included: *Clostridium perfringens* ATCC™ 13124 (susceptible) and *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (resistant).

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

## RESULTS

The degree of susceptibility of the test organism is determined by recording the presence or absence of growth, as judged by visible turbidity, in the three tubes. For the test to be valid, growth must be present in tube #1 and there must be no growth in tube #3. Growth in tube #3 would indicate disc contamination or faulty technique.

1. If growth is present in tube #1 and not in tube #2 and #3, the organism is inhibited by ≤ 16 µg of metronidazole per milliliter of medium and is considered susceptible.
2. If growth is present in tubes #1 and #2 and is not present in tube #3, the organism is considered to be resistant to metronidazole (>16 µg/mL).
3. If growth is absent from tube #1 or present in tube #3, the test is invalid and should be repeated.

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Contaminating organisms may be present in tube #2 even though tube #3 (sterility control) shows no growth; this could be falsely interpreted as resistance of the test organism to metronidazole.

## EXPECTED VALUES

Cumulative Percentage of Inhibition of Anaerobic Bacteria by Metronidazole Chemical.

Organisms	Number of Strains	Percentage Inhibited at				References
		≤ 4 µg/mL	≤ 8 µg/mL	≤ 16 µg/mL	≥ 100 µg/mL only	
<i>Bacteroides fragilis</i> group	679	88	95	98	1	5-15
<i>Bacteroides</i>	476	89	92	93	5	6,11,13-17
<i>Fusobacterium</i>	146	98	99	99	1	11,13-15,18,19
<i>Clostridium perfringens</i>	336	96	99	99	0	11,13-15,20
<i>Clostridium</i>	384	82	92	97	1	11-15,19-21
<i>Peptococcus</i>	253	85	87	87	11	11,14
<i>Peptostreptococcus</i>	177	68	70	72	21	11,14
<i>Veillonella</i>	39	74	79	87	13	11,13
<i>Propionibacterium</i>	203	2	3	3	97	11,13,14
<i>Eubacterium</i>	111	64	68	68	26	11,13,14
<i>Lactobacillus</i>	36	50	56	56	39	11,14
<i>Actinomyces</i>	20	20	20	25	45	11,14
<i>Bifidobacterium</i>	25	36	52	60	32	11,14

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In clinical trials utilizing discs for determining susceptibility of anaerobes to metronidazole, the incidence of false negatives for metronidazole elution discs was 1.6% compared to the method described by Tally.<sup>22</sup>

## AVAILABILITY

Cat. No.	Description
231604	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Metronidazole Elution Discs, 80 µg, single cartridge of 50 discs
231605	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Metronidazole Elution Discs, 80 µg, Pkg. of 10 cartridges

## REFERENCES

- Schneierman, S.S. 1954. A simple rapid disc-tube method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics. *Antibiot. Chemother.* 4:125-132.
- Wilkins, T.D. and T. Thiel. 1972. Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3:350-356.
- Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 1999. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis
- Dornbusch, K., C.E. Nord, and T. Wadstrom. 1974. *Scand. J. Infect. Dis.* 6:253-258.
- Hohne, C. 1977. *Gesundheitswes. Disinfekt.* 32:1146-1149.
- Nastro, L.J., and S.M. Finegold. 1972. *J. Infect. Dis.* 126:104-107
- Jokipii, L., and A.M.M. Jokipii. 1977. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:571-578.
- Santorio, J., D. Kaye, and M.E. Levison. 1976. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:188-190.
- Whelan, J.P.F., and J.H. Hale. 1973. *J. Clin. Pathol.* 26:393-395.
- Chow, A.W., D. Bednorz, and L.B. Guze. 1977. *Excerpta Medica*, p. 286-292.
- Dubois, J., J.C. Pechere, and P. Turgeon. 1978. *J. Antimicrob. Chemother.* 4:329-334
- Wust, J. 1977. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:631-656.
- Sutter, V.L., and S.M. Finegold. 1977. *Excerpta Medica*, p. 279-285.
- Staneck, J.L., and J.A. Washington II. 1974. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6:311-315.
- Murray, P.R., and J.E. Rosenblatt. 1977. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:605-608.
- Wise, R., J.M. Andrews, and K.A. Bedford. 1977. *J. Infect. Dis.* 23:19-24.
- Rodriguez, J.A.C., J.E.G. Sanchez, M.C.S. Gonzales, and J.P. Prieto. 1977. *Pharmatherapeutica* 1:573-582.
- Henderson, D.K., A.W. Chow, and L.B. Guze. 1977. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:679-695.
- Dornbusch, K., and C.E. Nord. 1974. *Med. Microbiol. Immunol.* 160:265-267.
- Tally, F.P., et al. 1974. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:589-593.
- Tally, F.P., N.V. Jacobus, and S.J. Gorbach. 1978. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:436-438.

# **BD BBL Sensi-Disc Elution Discs** pour le test de sensibilité des anaérobies

Agent antimicrobien	Code	Conc.
Métronidazole	MET-80	80 µg

Français

## APPLICATION

Les **BBL Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs (disques pour élution au métronidazole) servent à la réalisation d'évaluations *in vitro* de la sensibilité au métronidazole de bactéries anaérobies, au moyen de la méthode d'élution par disque en bouillon.

## RESUME ET EXPLICATION

En 1959, Schneierman<sup>1</sup> a décrit une méthode pour tester la sensibilité des bactéries face aux antibiotiques. Dans cette méthode, un disque de papier est imprégné d'une concentration déterminée d'antibiotiques, puis placé à l'intérieur d'un tube de bouillon. La concentration d'antibiotiques avoisine la concentration pouvant être obtenue dans le sang. La méthode a été appelée " méthode de diffusion sur disques en bouillon ". En 1972, Wilkins et Thiel<sup>2</sup> ont modifié cette méthode de test de sensibilité des anaérobies, en plaçant les disques dans un milieu pré-réduit. Le principal avantage de la méthode des disques en bouillon est qu'elle permet de tester la sensibilité aux antibiotiques de la plupart des isolats issus de microorganismes anaérobies. L'inconvénient principal est qu'elle ne permet pas de déterminer le degré de sensibilité ou de résistance. En 1990, le NCCLS a cessé de répertorier cette méthode comme alternative valide pour tester la sensibilité des microorganismes anaérobies, en raison de son manque de fiabilité et de sa faible corrélation par rapport aux méthodes standard.

## PRINCIPES DE LA METHODE

Un disque de papier contenant une concentration d'agent antimicrobien spécifique est ajouté dans un bouillon. L'agent antimicrobien se diffuse par élution dans le bouillon à partir du disque de papier. Le microorganisme à tester est ensemencé à l'intérieur d'un tube contenant le bouillon et le disque imprégné d'agent antimicrobien, ainsi qu'à l'intérieur d'un tube de contrôle contenant uniquement du bouillon. Au terme d'une période d'incubation appropriée, la sensibilité est déterminée en comparant la quantité de croissance obtenue dans le tube contenant le disque imprégné d'agent antimicrobien, avec celle obtenue dans le tube de contrôle.

## REACTIFS

Les disques **Sensi-Disc** sont préparés en imprégnant du papier absorbant de haute qualité avec des quantités d'agents antimicrobiens déterminées de manière précise. Les disques sont clairement identifiés des deux côtés par des lettres et des chiffres désignant l'agent et sa concentration. Les agents **Sensi-Disc** sont fournis en cartouches de 50 disques chacune. Un " X " sur le dernier disque de chaque cartouche indique que celui-ci contient le médicament codé. Les cartouches sont prévues pour les distributeurs de disque unique.

## Avvertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

En 1990, le NCCLS a cessé de répertorier cette méthode comme alternative valide pour tester la sensibilité des microorganismes anaérobies, en raison de son manque de fiabilité et de sa faible corrélation par rapport aux méthodes standard.

**Instructions pour la conservation :** Conserver les **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs dans l'obscurité, entre -20 et +8 °C.

**Détérioration du produit :** Jeter les disques dont la date de péremption est dépassée. Jeter également les cartouches desquelles on a fréquemment prélevé des disques pendant une semaine. Jeter les cartouches laissées toute une nuit à température ambiante, ou tester les performances des disques. La date de péremption s'applique aux disques conservés dans des emballages intacts conservés conformément aux instructions. Ne pas ouvrir prématurément.

## PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons adaptés à la culture peuvent être manipulés selon différentes techniques. Pour plus d'informations, consulter les publications citées en référence.<sup>3,4</sup> Prélever les échantillons avant l'administration des agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire.

## METHODE

**Matériaux fournis :** Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs.

**Matériaux requis mais non fournis :** Milieux de culture auxiliaires, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis pour cette procédure.

### Milieu de culture

Milieu au thioglycolate sans indicateur (135C), enrichi avec 5 µg/mL d'hémine avant traitement à l'autoclave, puis avec 0,1 µg/mL de vitamine K<sub>1</sub> et 1 mg/mL de bicarbonate de sodium juste avant utilisation.

Le milieu doit être distribué en volumes de 5 mL dans des tubes à essai de 13 x 100 mm munis de bouchons à vis, puis autoclavé à 121 °C pendant 15 min.

### Inoculum

Préparer l'inoculum en incubant le microorganisme entre 35 et 37 °C dans un milieu au thioglycolate sans indicateur (135C), complémenté en hémine, vitamine K<sub>1</sub> et bicarbonate de sodium, jusqu'à obtention d'une turbidité visible. Il convient de diluer ensuite cette culture dans un bouillon stérile limpide (porté à ébullition puis refroidi juste avant utilisation) jusqu'à ce que la solution corresponde à un standard de turbidité en sulfate de barium (standard McFarland 0,5).

Le standard au sulfate de barium peut être préparé en ajoutant 0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> à 0,048 M [1,175 % (p/v) BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O] à 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1 % (v/v)]. à 0,36N. La suspension de sulfate de barium peut être répartie dans des tubes à bouchons à vis, qu'il convient de refermer hermétiquement et de conserver dans l'obscurité, à température ambiante en vue d'une utilisation ultérieure. Mélanger cette suspension standard de sulfate de barium immédiatement avant son utilisation, en agitant vigoureusement les tubes.

### Mode opératoire du test :

1. Préparer et étiqueter trois tubes de milieu réduit.
2. Ajouter un **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Disc dans les tubes n° 2 et 3. Le tube n° 1 fait office de tube de contrôle et ne doit pas recevoir de disque. Le tube n° 3 sert de contrôle de stérilité pour les disques de métronidazole.
3. Incuber les tubes entre 35 et 37 °C pendant 2 h afin de laisser le produit s'équilibrer dans la totalité du milieu.
- 4.ensemencer les tubes n° 1 et n° 2 avec 0,1 mL d'inoculum dilué comme indiqué à la section **Inoculum** ci-dessus.
5. Desserrer les bouchons et incuber les tubes entre 35 et 37 °C, en atmosphère anaérobie (p. ex. dans une boîte à gants ou un récipient anaérobie, etc.).

La durée de la période d'incubation varie en fonction de la vitesse de croissance du microorganisme à tester ; c'est le développement d'une turbidité visible dans le tube no 1 qui permet de la déterminer.

**Contrôle de qualité par l'utilisateur :** Souches de contrôle recommandées pour les procédures de test de sensibilité standardisées. Il est recommandé d'inclure les souches suivantes chaque fois que le test est réalisé : *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (sensible) et *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (résistante).

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives NCCLS et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

## RESULTATS

La détermination du degré de sensibilité du microorganisme à tester se fonde sur l'enregistrement de la présence ou de l'absence de croissance, révélée par l'observation d'une turbidité visible dans les trois tubes. Les résultats du test sont considérés comme valides si une croissance est observée dans le tube n° 1 tandis que le tube n° 3 n'en présente aucune. L'apparition de croissance à l'intérieur du tube n° 3 est révélatrice d'une contamination du disque ou d'une technique inappropriée.

1. Si une croissance est constatée dans le tube n° 1 et qu'aucune croissance n'est visible dans les tubes n° 2 et n° 3, le microorganisme est inhibé par ≤ 16 µg de métronidazole par millilitre de milieu et donc considéré comme sensible.
2. Si une croissance est constatée dans les tubes n° 1 et n° 2, mais qu'aucune croissance n'est visible dans le tube n° 3, le microorganisme est considéré comme résistant au métronidazole (>16 µg/mL).
3. Si aucune croissance n'est constatée dans le tube n° 1, ou en cas de croissance dans le tube n° 3, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

## LIMITES DE LA PROCEDURE

Des microorganismes contaminants sont susceptibles d'être présents à l'intérieur du tube n° 2 même si le tube no 3 (contrôle de stérilité) ne révèle aucune croissance ; cela risque de fausser les résultats et de mener à la conclusion erronée d'une résistance du microorganisme au métronidazole.

## VALEURS ATTENDUES

Pourcentage cumulatif de l'inhibition des bactéries anaérobies au moyen de l'agent chimique métronidazole.

### Pourcentage de bactéries inhibées à

Microorganismes	Nombre de souches	≤ 4 µg/mL	≤ 8 µg/mL	≤ 16 µg/mL	≥ 100 µg/mL uniquement	Références
Groupe des <i>Bacteroides fragilis</i>	679	88	95	98	1	5-15
<i>Bacteroides</i>	476	89	92	93	5	6,11,13-17
<i>Fusobacterium</i>	146	98	99	99	1	11,13-15,18,19
<i>Clostridium perfringens</i>	336	96	99	99	0	11,13-15,20
<i>Clostridium</i>	384	82	92	97	1	11-15,19-21
<i>Peptococcus</i>	253	85	87	87	11	11,14
<i>Peptostreptococcus</i>	177	68	70	72	21	11,14
<i>Veillonella</i>	39	74	79	87	13	11,13
<i>Propionibacterium</i>	203	2	3	3	97	11,13,14
<i>Eubacterium</i>	111	64	68	68	26	11,13,14
<i>Lactobacillus</i>	36	50	56	56	39	11,14
<i>Actinomyces</i>	20	20	20	25	45	11,14
<i>Bifidobacterium</i>	25	36	52	60	32	11,14

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Lors de l'exécution d'essais cliniques faisant appel à des disques pour déterminer la sensibilité des microorganismes anaérobies au métronidazole, le pourcentage de faux négatifs observé dans les disques pour élution au métronidazole était de 1,6 %, en comparaison avec la méthode décrite par Tally.<sup>22</sup>

## CONDITIONNEMENT

No réf.	Description
231604	BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs, 80 µg, cartouche unique de 50 disques
231605	BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs, 80 µg, coffret de 10 cartouches

REFERENCES : voir la rubrique "References" du texte anglais

# BD BBL Sensi-Disc Elution Discs zur Empfindlichkeitsprüfung von anaeroben Mikroorganismen

Antibiotikum	Code	Konz.
Metronidazol	MET-80	80 µg

Deutsch

## VERWENDUNGSZWECK

BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs (BBL Sensi-Disc Metronidazol-Elutionsblättchen) dienen zur Bestimmung der *in vitro*-Empfindlichkeit von anaeroben Bakterien gegenüber Metronidazol durch den Bouillon-Blättchen-Test.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

1959 beschrieb Schneierson<sup>1</sup> eine Methode zur Überprüfung der antibiotischen Empfindlichkeit von Bakterien. Bei dieser Methode wird ein Papierblättchen mit einer bekannten Konzentration eines Antibiotikums imprägniert und in ein mit Bouillon gefülltes Röhrchen gegeben. Die Konzentration des Antibiotikums entspricht etwa der erreichbaren Konzentration des Antibiotikums im Blut. Diese Methode wurde "Bouillon-Blättchen-Methode" genannt. 1972 modifizierten Wilkins und Thiel<sup>2</sup> diese Testmethode für anaerobe Mikroorganismen, indem sie die Blättchen in ein vorreduziertes Medium gaben. Der größte Vorteil der Bouillon-Blättchen-Methode ist, dass die meisten anaeroben Isolate auf ihre antibiotische Empfindlichkeit hin überprüft werden können. Der größte Nachteil ist, dass der Grad der Empfindlichkeit oder der Resistenz nicht bestimmt werden kann. Diese Methode wurde 1990 vom NCCLS aufgrund ihrer Unzuverlässigkeit und der mangelnden Übereinstimmung mit Standardmethoden nicht mehr als zugelassene Alternativmethode zum Testen der Empfindlichkeit von anaeroben Mikroorganismen registriert.

## VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Ein Papierblättchen mit einer spezifischen Konzentration einer antimikrobiellen Substanz wird in ein Bouillon-Medium gegeben. Der antimikrobielle Wirkstoff wird von dem Papierblättchen in die Bouillon eluiert. Der Testorganismus wird in ein Röhrchen mit dem Bouillon-Medium und dem antimikrobiellen Blättchen sowie in ein Kontrollröhrchen, das nur das Bouillon-Medium enthält, inokuliert. Nach entsprechender Inokulation wird die Empfindlichkeit bestimmt, indem das Ausmaß des Wachstums in dem Röhrchen mit dem antimikrobiellen Blättchen und das Ausmaß des Wachstums im Kontrollröhrchen verglichen werden.

## REAGENZIEN

**Sensi-Disc**-Blättchen werden vorbereitet, indem qualitativ hochwertiges saugfähiges Papier mit genau bestimmten Mengen von antimikrobiellen Wirkstoffen imprägniert wird. Die Blättchen enthalten auf beiden Seiten eindeutig erkennbare Buchstaben und Ziffern zur Identifizierung der Substanz und zur Angabe der verwendeten Arzneimittelmenge. Die **Sensi-Disc**-Substanzen werden in Kartuschen mit jeweils 50 Blättchen geliefert. Das letzte Blättchen in jeder Kartusche ist mit einem "X" gekennzeichnet und enthält das laut Code angegebene Arzneimittel. Die Kartuschen werden in 1-Blättchen-Dispensiergeräten verwendet.

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

*In-vitro*-Diagnostikum.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen. Präparierte Röhren, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Diese Methode wurde 1990 vom NCCLS aufgrund ihrer Unzuverlässigkeit und der mangelnden Übereinstimmung mit Standardmethoden nicht mehr als zugelassene Alternativmethode zum Testen der Empfindlichkeit von anaeroben Mikroorganismen registriert.

**Aufbewahrung:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs sollten im Dunkeln bei -20 bis +8 °C aufbewahrt werden.

**Haltbarkeit des Produkts:** Verfallene Blättchen entsorgen. Zudem alle Kartuschen entsorgen, aus denen im Laufe einer Woche häufiger Blättchen entnommen wurden. Behälter, die über Nacht nicht im Kühlschrank aufbewahrt wurden, entsorgen oder die Blättchen entsprechend auf ihre Leistung testen. Das angegebene Verfallsdatum gilt nur für in ungeöffneten Packungen aufbewahrte Blättchen und bei Beachtung der entsprechenden Lagervorschriften. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen.

## PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Zur Kultivierung geeignete Proben können auf unterschiedliche Weise gehandhabt werden. Detaillierte Informationen sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.<sup>3,4</sup> Die Proben sollten vor der Anwendung von Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

## VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs.

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Zusätzliche Kulturmedien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte, die für dieses Verfahren benötigt werden.

### Kulturmedium

Thioglycollate Medium without Indicator – 135C, mit Zusatz von 5 µg/mL Hämin vor dem Autoklavieren und 0,1 µg/mL Vitamin K<sub>1</sub> sowie 1 mg/mL Natriumbikarbonat unmittelbar vor Gebrauch.

Das Medium sollte in Mengen von 5 mL in Röhren der Größe 13 x 100 mm mit Schraubverschluss abgegeben und 15 min lang bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert werden.

### Inokulum

Das Inokulum sollte vorbereitet werden, indem der Organismus bei 35 bis 37 °C im Thioglycollate Medium without Indicator – 135C mit Hämin, Vitamin K<sub>1</sub> und Natriumbikarbonat - inkubiert wird, bis eine sichtbare Trübung entsteht. Diese Kultur sollte dann mit einer sterilen klaren Bouillon (unmittelbar vor Gebrauch aufgekocht und abgekühlt) verdünnt werden, sodass sie dem Bariumsulfat-Trübungsstandard (0,5 McFarland-Standard) entspricht.

Der Bariumstandard kann erreicht werden, indem 0,5 mL 0,048 M BaCl<sub>2</sub> (1,175 % Gew./Vol. BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O) zu 99,5 mL 0,36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 % V/V) hinzugefügt werden. Die Bariumsulfatsuspension kann in Röhren mit Schraubverschluss abgefüllt werden, die fest verschlossen und bei Raumtemperatur im Dunkeln für spätere Verwendung aufbewahrt werden können. Diese Standard-Bariumsulfatsuspension muss unmittelbar vor Gebrauch gründlich durchgemischt werden.

### Testverfahren:

1. Drei Röhren mit reduzierten Medium vorbereiten und beschriften.
2. Je ein **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Disc zu Röhren 2 und 3 hinzufügen. Röhren 1 dient als Kontrollkultur und enthält kein Elutionsblättchen. Röhren 3 dient als Sterilitätskontrolle für die Metronidazol-Blättchen.
3. Die Röhren bei 35 bis 37 °C 2 h lang inkubieren, damit sich der Wirkstoff im Medium ebenmäßig verteilen kann.
4. Röhren 1 und 2, wie im Abschnitt **Inokulum** beschrieben, mit 0,1 mL des verdünnten Inokulums inokulieren.
5. Die Kappen lockern und die Röhren bei 35 bis 37 °C in einer anaeroben Atmosphäre (z. B. anaerobe Glove Box, anaerobes Glas, etc.) inkubieren.

Die Inkubationszeit hängt von der Wachstumsgeschwindigkeit des Testorganismus ab und kann durch das Entstehen sichtbarer Trübung in Röhren 1 bestimmt werden.

**Qualitätssicherung durch den Anwender:** Bei Standardempfindlichkeitstests werden Kontrollstämme empfohlen. Bei jeder Durchführung des Tests sollten folgende Stämme mit einbezogen werden: *Clostridium perfringens*, ATCC 13124 (empfindlich) und *Propionibacterium acnes*, ATCC 6919 (resistent).

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

## ERGEBNISSE

Der Empfindlichkeitsgrad des Testorganismus wird durch das Vorliegen oder Fehlen von Wachstum in den drei Röhren ermittelt, beurteilt nach der sichtbaren Trübung. Damit der Test als gültig betrachtet werden kann, muss in Röhren 1 Wachstum vorhanden sein und in

Röhrchen 3 darf kein Wachstum vorliegen. Wachstum in Röhrchen 3 zeigt an, dass eine Kontamination des Blättchens vorliegt oder eine falsche Technik angewandt wurde.

1. Liegt Wachstum in Röhrchen 1 vor und in Röhrchen 2 und 3 nicht, wird der Organismus durch  $\leq 16 \mu\text{g}$  Metronidazol pro Milliliter des Mediums gehemmt und gilt als empfindlich.
2. Liegt Wachstum in Röhrchen 1 und 2 vor und in Röhrchen 3 nicht, gilt der Organismus als resistent gegenüber Metronidazol ( $>16 \mu\text{g/mL}$ ).
3. Liegt in Röhrchen 1 kein Wachstum vor oder liegt in Röhrchen 3 Wachstum vor, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

#### VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Selbst wenn Röhrchen 3 (Sterilitätskontrolle) kein Wachstum vorweist, können kontaminierende Organismen in Röhrchen 2 vorhanden sein. Dies könnte fälschlicherweise als Resistenz des Testorganismus gegenüber Metronidazol gewertet werden.

#### ERWARTETE WERTE

Kumulative Prozentzahl der Hemmung von anaeroben Bakterien durch Metronidazol.

Organismen	Anzahl Stämme	Prozentsatz gehemmt bei				Literatur
		$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	$\leq 16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 100 \mu\text{g/mL}$ (ausschließl.)	
<i>Bacteroides fragilis</i> -Gruppe	679	88	95	98	1	5-15
<i>Bacteroides</i>	476	89	92	93	5	6,11,13-17
<i>Fusobacterium</i>	146	98	99	99	1	11,13-15,18,19
<i>Clostridium perfringens</i>	336	96	99	99	0	11,13-15,20
<i>Clostridium</i>	384	82	92	97	1	11-15,19-21
<i>Peptococcus</i>	253	85	87	87	11	11,14
<i>Peptostreptococcus</i>	177	68	70	72	21	11,14
<i>Veillonella</i>	39	74	79	87	13	11,13
<i>Propionibacterium</i>	203	2	3	3	97	11,13,14
<i>Eubacterium</i>	111	64	68	68	26	11,13,14
<i>Lactobacillus</i>	36	50	56	56	39	11,14
<i>Actinomyces</i>	20	20	20	25	45	11,14
<i>Bifidobacterium</i>	25	36	52	60	32	11,14

#### LEISTUNGSMERKMALE

In klinischen Studien, bei denen Blättchen zur Empfindlichkeitsüberprüfung von anaeroben Mikroorganismen gegenüber Metronidazol eingesetzt wurden, belief sich die Häufigkeit der falsch negativen Ergebnisse für Metronidazol-Elutionsblättchen auf 1,6 % verglichen mit der von Tally<sup>22</sup> beschriebenen Methode.

#### LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
231604	<b>BBL Sensi-Disc</b> Metronidazole Elution Discs, 80 $\mu\text{g}$ , einzelne Kartusche mit 50 Blättchen
231605	<b>BBL Sensi-Disc</b> Metronidazole Elution Discs, 80 $\mu\text{g}$ , Packung mit 10 Blättchen

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

## **BD BBL Sensi-Disc Elution Discs** per i test di sensibilità degli anaerobi

Antibiotico	Codice	Concentrazione
Metronidazolo	MET-80	80 $\mu\text{g}$

Italiano

#### USO PREVISTO

I **BBL Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs (dischi per eluizione di metronidazolo) trovano impiego per valutare la sensibilità *in vitro* dei batteri anaerobi al metronidazolo con il metodo di eluizione su disco in brodo.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Nel 1959, Schneierson<sup>1</sup> descrisse un metodo per testare la sensibilità dei batteri agli antibiotici. La procedura consisteva nell'introdurre in una provetta contenente brodo un disco di carta precedentemente impregnato con una concentrazione nota di antibiotico simile a quella che è possibile raggiungere nel sangue. Questo metodo è stato chiamato "metodo di eluizione su disco in brodo". Nel 1972, Wilkins e Thiel<sup>2</sup> hanno modificato questa procedura per testare gli anaerobi introducendo i dischi in un terreno pre-ridotto. Il principale vantaggio del metodo di eluizione su disco in brodo è che permette di valutare la sensibilità agli antibiotici della maggior parte degli isolati anaerobi, mentre il principale svantaggio è che non è possibile determinarne il grado di sensibilità o di resistenza. Nel 1990, per via della sua inaffidabilità e scarsa correlazione con i metodi standard convenzionali, questa procedura non è stata più elencata nei documenti NCCLS come metodo alternativo approvato per testare la sensibilità degli anaerobi.

#### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Un disco di carta contenente una concentrazione specifica di un agente antibiotico viene introdotto in un brodo di coltura. L'antibiotico contenuto nel disco di carta eluisce nel brodo. L'organismo da testare viene inoculato sia in una provetta contenente il brodo di coltura e il disco con l'antibiotico, che in una provetta di controllo contenente solo il brodo di coltura. Trascorso un periodo di incubazione appropriato, si valuta la sensibilità confrontando la

crescita nella provetta di controllo con la crescita nella provetta contenente il disco con l'antibiotico.

## REAGENTI

I **Sensi-Disc** sono dischi preparati impregnando carta assorbente di alta qualità con quantitativi accuratamente determinati di agenti antibiotici. I dischi sono contrassegnati in modo ben visibile su entrambi i lati da lettere e numeri indicanti l'agente e la rispettiva concentrazione. Gli agenti **Sensi-Disc** vengono forniti in cartucce da 50 dischi ciascuna. L'ultimo disco di ogni cartuccia è contrassegnato con una "X" e contiene il farmaco indicato dal codice. Le cartucce sono predisposte per l'uso in dispensatori a disco singolo.

### Avvertenze e precauzioni -

Per uso diagnostico *in vitro*.

Durante tutte le procedure, attenersi alle tecniche aseptiche e alle precauzioni stabilite contro i rischi microbiologici. Dopo l'uso e prima dell'eliminazione, sterilizzare in autoclave le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Nel 1990, per via della sua inaffidabilità e scarsa correlazione con i metodi standard, questa procedura non è stata più elencata nei documenti NCCLS come metodo alternativo approvato per testare la sensibilità degli anaerobi.

**Modalità di conservazione** – **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs devono essere conservati al buio a temperature comprese tra -20 e + 8 °C.

**Deterioramento del prodotto** – Eliminare i dischi scaduti. Eliminare anche le cartucce da cui sono stati tolti dischi frequentemente nel giro di una settimana e i contenitori lasciati fuori di notte nel laboratorio, oppure testare i dischi per accertarne le prestazioni. La data di scadenza vale per i dischi conservati secondo le istruzioni in contenitori integri. Non aprire fino al momento dell'uso.

## RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni dettagliate, consultare la documentazione appropriata.<sup>3,4</sup> Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

## PROCEDURA

**Materiale fornito** - **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs.

**Materiali richiesti ma non forniti** - Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie per questa procedura.

### Terreno di coltura

Terreno al tioglicollato senza indicatore – 135C, arricchito con 5 µg/mL di emina prima della sterilizzazione in autoclave e con 0,1 µg/mL di vitamina K<sub>1</sub> e 1 mg/mL di bicarbonato di sodio immediatamente prima dell'uso.

Il terreno deve essere dispensato in aliquote di 5 mL in provette per test con tappo a vite da 13 x 100 mm e sterilizzato in autoclave a 121° C per 15 min.

### Inoculo

Per preparare l'inoculo, incubare l'organismo a 35 – 37 °C in terreno al tioglicollato senza indicatore - 135C con emina, vitamina K<sub>1</sub> e bicarbonato di sodio, fino a quando si sviluppa una torbidità visibile. Diluire quindi questa coltura con un brodo limpido sterile (portato all'ebollizione e raffreddato immediatamente prima dell'uso) fino a quando la torbidità corrisponde allo standard del solfato di bario (McFarland 0,5).

Per preparare lo standard del solfato di bario è possibile aggiungere 0,5 mL di 0,048 M BaCl<sub>2</sub> [1,175% (peso/vol) BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O] a 99,5 mL di 0,36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [1% (vol/vol)]. La soluzione di solfato di bario può essere distribuita in provette con tappo a vite sigillate accuratamente e conservate al buio a temperatura ambiente per uso futuro. Mescolare energicamente questa sospensione standard di solfato di bario immediatamente prima dell'uso.

### Procedura del test -

1. Preparare ed etichettare tre provette di terreno ridotto.
2. Introdurre un **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Disc in ciascuna provetta n. 2 e n. 3. La provetta n. 1 serve come controllo della coltura e non deve contenere alcun disco. La provetta n. 3 serve da controllo della sterilità per i dischi al metronidazolo.
3. Incubare le provette per 2 ore a 35 – 37 °C per consentire una distribuzione equilibrata del farmaco in tutto il terreno.
4. Inoculare ciascuna provetta n. 1 e n. 2 con 0,1 mL della coltura diluita come descritto nella sezione **Inoculo** qui sopra.
5. Allentare i tappi a vite e incubare le provette a 35 – 37 °C in atmosfera anaerobica (es. camera anaerobica glove box, recipiente anaerobico, ecc.).

Il periodo di incubazione varia a seconda della rapidità di crescita dell'organismo e può essere stabilito in base alla comparsa di una torbidità visibile nella provetta n. 1.

**Controllo di qualità a cura dell'utente** - Ceppi di controllo raccomandati per il test di sensibilità standardizzato. Ogni volta che si esegue il test, includere i seguenti ceppi: *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (sensibile) e *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (resistente).

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per informazioni sulla prassi appropriata di controllo di qualità, si raccomanda all'utente di consultare le direttive NCCLS e le norme CLIA.

## RISULTATI

Il grado di sensibilità dell'organismo testato viene determinato in base alla presenza o assenza di crescita nelle tre provette, valutata in misura della torbidità visibile. Perché il test sia valido, la crescita deve essere presente nella provetta n. 1 e assente nella provetta n. 3. La crescita nella provetta n. 3 è indice di contaminazione del disco o di errori di tecnica.

1. Se la crescita è presente nella provetta n. 1 e assente nelle provette n. 2 e n. 3, significa che l'organismo viene inibito da ≤ 16 µg di metronidazolo per millilitro di terreno e viene considerato sensibile.

- Se la crescita è presente nelle provette n. 1 e n. 2 e assente nella provetta n. 3, l'organismo viene considerato resistente al metronidazolo (>16 µg/mL).
- Se la crescita è assente nella provetta n. 1 o presente nella provetta n. 3, il test non è valido e deve essere ripetuto.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

È possibile che organismi contaminanti siano presenti nella provetta n. 2, anche se la provetta n. 3 (controllo di sterilità) non evidenzia alcuna crescita; questo risultato potrebbe essere erroneamente interpretato come resistenza dell'organismo testato al metronidazolo.

#### VALORI ATTESI

Percentuale cumulativa di inibizione dei batteri anaerobi mediante reazione chimica al metronidazolo.

Organismi	Numero di ceppi	Percentuale inibita a				Bibliografia
		≤ 4 µg/mL	≤ 8 µg/mL	≤ 16 µg/mL	solo ≥ 100 µg/mL	
Gruppo						
<i>Bacteroides fragilis</i>	679	88	95	98	1	5-15
<i>Bacteroides</i>	476	89	92	93	5	6,11,13-17
<i>Fusobacterium</i>	146	98	99	99	1	11,13-15,18,19
<i>Clostridium perfringens</i>	336	96	99	99	0	11,13-15,20
<i>Clostridium</i>	384	82	92	97	1	11-15,19-21
<i>Peptococcus</i>	253	85	87	87	11	11,14
<i>Peptostreptococcus</i>	177	68	70	72	21	11,14
<i>Veillonella</i>	39	74	79	87	13	11,13
<i>Propionibacterium</i>	203	2	3	3	97	11,13,14
<i>Eubacterium</i>	111	64	68	68	26	11,13,14
<i>Lactobacillus</i>	36	50	56	56	39	11,14
<i>Actinomyces</i>	20	20	20	25	45	11,14
<i>Bifidobacterium</i>	25	36	52	60	32	11,14

#### PRESTAZIONI DELLA METODICA

In studi di sperimentazione clinica condotti utilizzando dischi per la determinazione della sensibilità degli anaerobi al metronidazolo, l'incidenza di falsi negativi per i dischi di eluizione al metronidazolo è stata di 1,6% rispetto al metodo descritto da Tally.<sup>22</sup>

#### DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
231604	BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs, 80 µg, cartuccia singola da 50 dischi
231605	BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs, 80 µg, confezione da 10 cartucce

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

## **BD BBL Sensi-Disc Elution Discs** para el análisis de sensibilidad de anaerobios

Agente antimicrobiano	Código	Conc.
Metronidazol	MET-80	80 µg

Español

#### USO PREVISTO

BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs (discos de elusión de metronidazol BBL Sensi-Disc) deben utilizarse para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de las bacterias anaerobias al metronidazol por medio del método de disco en caldo.

#### RESUMEN Y EXPLICACION

En 1959, Schneierson<sup>1</sup> describió un método para el análisis de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos. En este método, se impregna una concentración conocida de antibiótico en un disco de papel y se lo coloca en un tubo de caldo. La concentración de antibiótico se aproxima a la del antibiótico que se puede alcanzar en el torrente sanguíneo. Este método se denominó "método de disco en caldo". En 1972, Wilkins y Thiel<sup>2</sup> modificaron este método para analizar anaerobios colocando los discos en un medio previamente reducido. La ventaja principal del método de disco en caldo es que puede analizarse la sensibilidad a antibióticos de la mayoría de los aislados anaerobios. La desventaja más importante es que no puede determinarse el nivel de sensibilidad o resistencia. En 1990, el NCCLS dejó de incluir este método como método alternativo aprobado para el análisis de sensibilidad de anaerobios, debido a su falta de fiabilidad e insuficiente correlación con los métodos estándar.

#### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Se agrega un disco de papel con una concentración específica de antimicrobiano a un medio de caldo. El agente antimicrobiano se disuelve en el caldo desde el disco de papel, por medio de la elusión. El organismo de prueba se inocula en un tubo con el medio de caldo y el disco con antimicrobiano. Luego, se lo coloca en un tubo de control que contiene solamente el medio de caldo. Después de una incubación adecuada, se determina la sensibilidad comparando la cantidad de crecimiento en el tubo con el disco de antimicrobiano y la cantidad de crecimiento en el tubo de control.

## REACTIVOS

Los discos **Sensi-Disc** se preparan impregnando papel absorbente de alta calidad con cantidades exactas de agentes antimicrobianos. Los discos están marcados claramente en ambos lados con letras y números que indican el agente y el contenido del fármaco. Los agentes **Sensi-Disc** se suministran en cartuchos que contienen 50 discos cada uno. El último disco de cada cartucho está marcado con una "X" y contiene el fármaco según su código. Los cartuchos se deben utilizar en dispensadores de un solo disco.

### Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todos los procedimientos. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

En 1990, el NCCLS dejó de incluir este método como método alternativo aprobado para el análisis de sensibilidad de anaerobios, debido a su falta de fiabilidad e insuficiente correlación con los métodos estándar.

**Instrucciones de almacenamiento:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs deben almacenarse en un lugar oscuro a temperaturas entre -20 y +8 °C.

**Deterioro del producto:** Desechar los discos que ya han caducado. También desechar los cartuchos de los que se hayan retirado discos con frecuencia en el transcurso de una semana. Desechar los recipientes que se hayan dejado en el laboratorio fuera del refrigerador toda la noche; de no ser así, se deben probar para determinar su rendimiento. La fecha de caducidad es aplicable a los discos almacenados en la forma indicada, en el envase intacto. No abrir hasta que vayan a utilizarse.

## RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes<sup>3,4</sup>. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

## PROCEDIMIENTO

**Material suministrado:** **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Discs.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Medios de cultivo auxiliar, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera para llevar a cabo este procedimiento.

### Medio de cultivo

Medio Tioglicolato sin indicador - 135C, enriquecido con 5 µg/mL de hemina antes de procesar en autoclave, y 0,1 µg/mL de vitamina K<sub>1</sub> y 1 mg/mL de bicarbonato de sodio momentos antes de su utilización.

El medio se debe verter de a 5 mL en tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapa a rosca y procesar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

### Inóculo

El inóculo debe prepararse incubando el organismo a 35 – 37 °C en medio Tioglicolato sin indicador - 135C con hemina, vitamina K<sub>1</sub> y bicarbonato de sodio hasta que se produzca turbidez visible. Luego, este cultivo debe diluirse con un caldo estéril transparente (hervido y enfriado momentos antes de su utilización) para alcanzar un patrón de turbidez de sulfato de bario (patrón 0,5 de McFarland).

El patrón de bario puede prepararse agregando 0,5 mL de 0,048M BaCl<sub>2</sub> (1,175% p/v BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O) a 99,5 mL de 0,36N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v). La suspensión de sulfato de bario puede distribuirse en tubos con tapa roscada, los que se sellan herméticamente y se almacenan en un lugar oscuro a temperatura ambiente para su utilización futura. Esta suspensión estándar de sulfato de bario debe mezclarse enérgicamente justo antes de utilizar.

### Procedimiento del análisis:

1. Preparar y rotular tres tubos de medio reducido.
2. Agregar un **Sensi-Disc** Metronidazole Elution Disc a cada uno de los tubos N° 2 y N° 3. El tubo N° 1 sirve como control de cultivo y no se le coloca un disco. El tubo N° 3 sirve como control de esterilidad para los discos con metronidazol.
3. Incubar los tubos a 35 – 37 °C durante 2 h para permitir el equilibrio del fármaco en todo el medio.
4. Inocular cada uno de los tubos N° 1 y N° 2 con 0,1 mL del inóculo diluido como en la sección **Inóculo** anterior.
5. Aflojar las tapas e incubar los tubos a 35 – 37 °C en atmósfera anaerobia (por ej., caja de manipulación con guantes en atmósfera anaerobia, jarra anaerobia, etc.).

La duración del período de incubación variará según la rapidez de crecimiento del organismo de prueba y puede determinarse por la apariencia de turbidez visible en el tubo N° 1.

**Control de calidad del usuario:** Cepas de control recomendadas para análisis de sensibilidad normalizados. Cada vez que se realiza el análisis, se deben incluir las siguientes cepas: *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (sensible) y *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (resistente).

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

## RESULTADOS

El nivel de sensibilidad del organismo de prueba se determina mediante la presencia o ausencia de crecimiento, según el nivel de turbidez visible, en los tres tubos. Para que la prueba sea válida, debe detectarse crecimiento en el tubo N° 1 y no debe haber crecimiento en el tubo N° 3. La presencia de crecimiento en el tubo N° 3 indicaría contaminación del disco o falla en la técnica.

1. Si hay crecimiento en el tubo N° 1 y no en el N° 2 ni en el N° 3, se produce la inhibición del organismo mediante  $\leq 16 \mu\text{g}$  de metronidazol por mililitro de medio y se lo considera sensible.
2. Si hay crecimiento en los tubos N° 1 y N° 2 y no en el N° 3, el organismo se considera resistente al metronidazol ( $>16 \mu\text{g/mL}$ ).
3. Si no hay crecimiento en el tubo N° 1 pero sí en el N° 3, la prueba no es válida y debe repetirse.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Puede haber organismos contaminantes en el tubo N° 2 aunque el tubo N° 3 (control de esterilidad) no muestre crecimiento, lo que podría interpretarse falsamente como resistencia del organismo de prueba a metronidazol.

#### VALORES PREVISTOS

Porcentaje acumulativo de inhibición de bacterias anaerobias debido a la sustancia química metronidazol.

Organismos	Cant. de cepas	Porcentaje de inhibición con				Referencias
		$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	$\leq 16 \mu\text{g/mL}$	$\geq 100 \mu\text{g/mL}$ solamente	
Grupo						
<i>Bacteroides fragilis</i>	679	88	95	98	1	5-15
<i>Bacteroides</i>	476	89	92	93	5	6,11,13-17
<i>Fusobacterium</i>	146	98	99	99	1	11,13-15,18,19
<i>Clostridium</i>						
<i>perfringens</i>	336	96	99	99	0	11,13-15,20
<i>Clostridium</i>	384	82	92	97	1	11-15,19-21
<i>Peptococcus</i>	253	85	87	87	11	11,14
<i>Peptostreptococcus</i>	177	68	70	72	21	11,14
<i>Veillonella</i>	39	74	79	87	13	11,13
<i>Propionibacterium</i>	203	2	3	3	97	11,13,14
<i>Eubacterium</i>	111	64	68	68	26	11,13,14
<i>Lactobacillus</i>	36	50	56	56	39	11,14
<i>Actinomyces</i>	20	20	20	25	45	11,14
<i>Bifidobacterium</i>	25	36	52	60	32	11,14

#### CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

En estudios clínicos en los que se utilizaron discos para determinar la sensibilidad de anaerobios al metronidazol, la incidencia de negativos falsos en los discos de elusión con metronidazol fue del 1,6%, en comparación con el método descrito por Tally<sup>22</sup>.

#### DISPONIBILIDAD

N° de cat.	Descripción
231604	<b>BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs</b> , 80 $\mu\text{g}$ , cartucho único de 50 discos
231605	<b>BBL Sensi-Disc Metronidazole Elution Discs</b> , 80 $\mu\text{g}$ , paquete 10 cartuchos

REFERENCIAS Ver "Referencias" en el texto en inglés.



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




Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Използвайте до / A se utiliza până la / Son kulanma tarihi / Upotrebiti do / Исползовать до / дейін пайдаланува / Upotrijebiti do /  
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /  
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /  
 ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af måneden) /  
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /  
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /  
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /  
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /  
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /  
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /  
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /  
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /  
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mensesio pabaiga) /  
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /  
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /  
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /  
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) /  
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /  
 ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden) /  
 ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = края на месеца) /  
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /  
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /  
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /  
 ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = конец месяца) /  
 ЖӨЖӨК-АА-КК / ЖӨЖӨК-АА (АА = айдың соңы) /  
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)


**REF** Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Καταложен номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Katalog nөмірі


**EC REP** Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő a Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Авторизирован представитель в EU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Автура Топлuluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU


**IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaite / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жагдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku

 Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura

**LOT** Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch code (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)

 Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenuto sufficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contém suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточно для <n> тестов(а) / <n> тесттері үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova

 Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu

 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
800-638-8663  
www.bd.com/ds

**EC REP** Benex Limited  
Rineanna House  
Shannon Free Zone  
Shannon, County Clare, Ireland