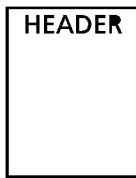


Revisions

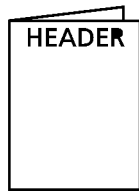
Rev from	Rev to	ECO #
2009/11	2010/10	5571-10

Notes:

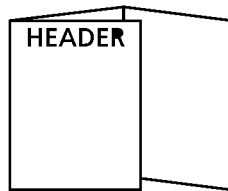
- BD Cat. Number 245127
- Blank (Sheet) Size : Length: 7 7/8" Width: 8 1/2"
 Number of Pages: 32 Number of Sheets: 8
 Page Size: Length 7 7/8" Width 4 1/4" Final Folded Size: 7 7/8" x 4 1/2"
- Style (see illustrations below): # 5



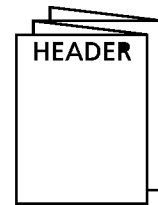
#1



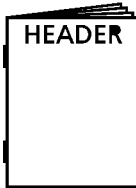
#2



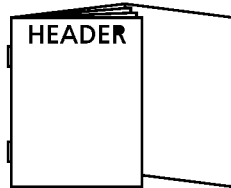
#3



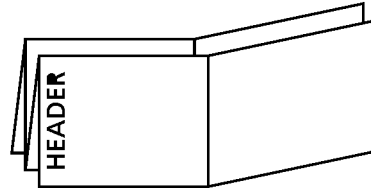
#4



#5




#6




#7

- See Specification Control Number N/A for Material Information
- Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS# Black
- 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	 Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 88-2041-1JAA		Category and Description Package Insert, BACTEC MGIT 960 SIRE EMB 7.5	Sheet: 1 of 33 Scale: N/A	A

BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*

English: pages 1 – 6 Italiano: pagine 17 – 22
Français : pages 7 – 12 Español: páginas 22 – 27
Deutsch: Seiten 12 – 17

 88-2041-1JAA
2010/10

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΗΣΤΕ ΜΕ ΤΟΝ ΤΟΠΙΚΟ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟ ΤΗΣ ΒD ΓΙΑ ΟΔΗΓΙΕΣ. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcję 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. / **Обратите се свом локалном представнику компаније BD за упутства.** / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / **Өзіндік жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз.** / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

The **BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit** is used as a rapid qualitative procedure for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol using the **BACTEC™ MGIT™ 960** and **BACTEC™ MGIT™ 320 Systems**.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antimycobacterial susceptibility testing is necessary for the proper treatment of patients with tuberculosis. The treatment of tuberculosis is commonly through a multiple drug regimen which includes the antimycobacterial drugs streptomycin, isoniazid, rifampin and/or ethambutol. It is important that the antimycobacterial drugs prescribed show appropriate activity against *Mycobacterium tuberculosis*, i.e., susceptibility of the isolate to the drug.

Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) has recently become a serious public health problem.¹ Resistance to any of the four primary drugs, streptomycin (STR), isoniazid (INH), rifampin (RIF), and ethambutol (EMB), makes the disease more difficult and expensive to treat. The rapid detection of these strains is critical to the effective treatment of the patient.

Two methods have been widely used for antimycobacterial susceptibility testing. The first method, known as the Method of Proportion,² uses Middlebrook and Cohn 7H10 Agar. It compares colony counts on drug-containing and drug-free media. Resistance to a drug is detected when 1% or more of the bacterial population is resistant to the drug concentration under test. Results are generally available after 21 days of incubation. The second method, known as the **BACTEC™ 460TB** radiometric susceptibility method,³ generally takes from 4 to 12 days. It is based on the production of radioactive ¹⁴C-labeled carbon dioxide by the growing mycobacteria, manifested by a growth index increase in the system.

Historically, the Method of Proportion (MOP) procedure has included susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using two concentrations of antimicrobials. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) continues to recommend that the MOP test procedure include two concentrations of the primary drugs for testing except rifampin. The recommended low concentrations for the MOP procedure are generally considered to be the critical concentrations for these drugs. The critical concentration is defined as the drug concentration which inhibits the wild type sub-population while allowing sufficient growth of the mutant resistant sub-population in order to determine resistance at the critical proportion of 1%. The high drug concentration is not considered to be the critical concentration. However, resistance at the high concentration is evidence that resistance is generally distributed among the population of the test *M. tuberculosis* strain. Some clinicians use the susceptibility test results at the high concentrations to profile the degree of resistance of the test strain.

The **BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE** test provides the susceptibility result in approximately the same time frame as the **BACTEC™ 460TB** system. In addition, this method is non-radiometric and allows appropriate antibiotic susceptibility results to be reported earlier, in most cases, than with the MOP procedure.

The **BACTEC MGIT** system has been developed to allow susceptibility testing at the critical concentration for streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol, and at a higher concentration for streptomycin, isoniazid, and ethambutol. These concentrations correlate with the two concentrations used in the MOP procedure. A susceptible result at the critical concentration can be reported and no other tests are necessary. However, any strain determined to be resistant with the **BACTEC MGIT 960 SIRE** kit to streptomycin, isoniazid, and ethambutol at the critical concentration may be, at a minimum, tested at the high concentration. In this case, a final result of resistant at the critical concentration may be reported, with notification that an additional test at the high concentration is being performed.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The **BBL™ MGIT™ 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube** is a tube containing a modified Middlebrook 7H9 Broth which supports the growth and detection of mycobacteria (see **BBL MGIT 7 mL** package insert). The **MGIT** tube contains a fluorescent compound embedded in silicone on the bottom of a 16 x 100 mm round-bottom tube. The fluorescent compound is sensitive to the presence of oxygen dissolved in the broth. The initial concentration of dissolved oxygen quenches the emission from the compound, and little fluorescence can be detected. Later, actively respiring microorganisms consume the oxygen which allows the compound to fluoresce.

The **BACTEC MGIT 960 SIRE Kit** is a 4 – 13 day qualitative test. The test is based on growth of the *Mycobacterium tuberculosis* isolate in a drug-containing tube compared to a drug-free tube (Growth Control). The **BACTEC MGIT** instrument monitors tubes for increased fluorescence. Analysis of fluorescence in the drug-containing tube compared to the fluorescence of the Growth Control tube is used by the instrument to determine susceptibility results.

The **BACTEC MGIT** instrument automatically interprets these results using predefined algorithms (which compare growth in the drug containing tube to that in the Growth Control tube) and the susceptible or resistant result is reported by the instrument.

REAGENTS

BACTEC MGIT 960 SIRE Kit contains one each lyophilized vials of streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol, and eight vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Streptomycin (STR) 332 µg

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Isoniazid (INH) 33.2 µg

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Rifampin (RIF) 332 µg

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Ethambutol (EMB) 1660 µg

BACTEC MGIT STR 4.0 Kit contains one vial lyophilized streptomycin and two vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Streptomycin 664 µg

BACTEC MGIT INH 0.4 Kit contains one vial lyophilized isoniazid and two vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Isoniazid 66.4 µg

BACTEC MGIT EMB 7.5 Kit contains one vial lyophilized ethambutol and two vials of SIRE Supplement.

Approximate Formula* Per Vial Lyophilized drug: Ethambutol 1245 µg

BACTEC MGIT 960 SIRE Supplement contains 20 mL Middlebrook OADC enrichment

Approximate Formula* Per L Purified Water

Bovine albumin.....50.0 g Catalase.....0.03 g

Dextrose20.0 g Oleic Acid.....0.6 g

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Storage and reconstitution of reagents: **BACTEC MGIT 960 SIRE Drug vials** – on receipt, store the lyophilized drug vials at 2 – 8°C. Once reconstituted, the antibiotic solutions may be frozen and stored at -20°C or colder up to six months, not to exceed the original expiration date. Once thawed, use immediately. Discard unused portions.

BACTEC MGIT SIRE Supplement – On receipt, store in dark at 2 – 8°C. Avoid freezing or overheating. Open and use prior to the expiration date. Minimize exposure to light.

Directions For Use:

Reconstitute each **BACTEC MGIT 960 SIRE Kit Streptomycin** lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 83 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT 960 SIRE Kit Isoniazid** lyophilized drug vial with **4 mL** of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 8.3 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT 960 SIRE** Kit Rifampin lyophilized drug vial with 4 mL of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 83 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC MGIT 960 SIRE** Kit Ethambutol lyophilized drug vial with 4 mL of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 415 µg/mL.

NOTE: The following are reconstituted with a different volume. Failure to use the appropriate volume of sterile distilled water for reconstitution of the higher drug concentrations will invalidate those test results.

Reconstitute each **BACTEC™ MGIT™ 960 STR 4.0** Kit streptomycin lyophilized drug vial with 2 mL of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 332 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC™ MGIT™ 960 INH 0.4** Kit isoniazid lyophilized drug vial with 2 mL of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 33.2 µg/mL.

Reconstitute each **BACTEC™ MGIT™ 960 EMB 7.5** Kit ethambutol lyophilized drug vial with 2 mL of sterile distilled/deionized water to make a stock solution of 622.5 µg/mL.

WARNINGS:

For *in vitro* Diagnostic Use.

POTENTIALLY INFECTIOUS TEST SPECIMEN: Observe “Universal Precautions”⁴ and institutional guidelines when handling and disposing of infectious materials.

Working with *M. tuberculosis* growth in culture requires Biosafety Level (BSL) 3 practices, containment equipment and facilities.

Read and follow directions contained in all appropriate package inserts including the **BBL™ MGIT™ 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tube**.

Prior to use, the user should examine the tubes and vials for evidence of contamination or damage. Discard any tubes or vials if they appear unsuitable or if **MGIT** tubes exhibit fluorescence prior to use.

In the event of tube breakage: 1) Close the instrument drawers; 2) Turn off the instrument; 3) Vacate the area immediately; 4) Consult your facility/CDC guidelines. An inoculated leaking or broken tube may produce an aerosol of mycobacteria; appropriate handling should be observed.

Autoclave all inoculated **MGIT** tubes prior to disposal.

SPECIMEN PREPARATION

All preparations detailed below are from cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. The laboratory should confirm, by appropriate identification techniques, that the isolate to be tested is a pure culture.

Preparation of the Isolate from Solid Media:

1. Add 4 mL of **BBL™ Middlebrook 7H9 Broth** (or **BBL MGIT** broth) to a 16.5 x 128 mm sterile tube with cap containing 8 – 10 glass beads.
2. Scrape with a sterile loop as many colonies as possible from growth no more than 14 days old, trying not to remove any solid medium. Suspend the colonies in the Middlebrook 7H9 Broth. The suspension should exceed in turbidity a 1.0 McFarland standard.
3. Vortex the suspension for 2 – 3 min to break up the larger clumps.
4. Let the suspension sit for 20 min without disturbing.
5. Transfer the supernatant fluid to another 16.5 x 128 mm sterile tube with cap (avoid transferring any of the sediment) and let sit for another 15 min.
6. Transfer the supernatant fluid (it should be smooth, free of any clumps) to a third 16.5 x 128 mm sterile tube.
7. Adjust the suspension to a 0.5 McFarland standard by visual comparison to a 0.5 McFarland turbidity standard.
8. Dilute 1 mL of the adjusted suspension in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution).

Preparation from a Positive BACTEC MGIT Tube:

1. For the preparation of the test inoculum, a positive 7 mL **MGIT** tube should be used the day after it first becomes positive on the **BACTEC MGIT** instrument (Day 1), up to and including the fifth day (Day 5) after instrument positivity. A tube which has been positive longer than five days should be subcultured to a fresh 7 mL **MGIT** tube containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement and tested on the **BACTEC MGIT** instrument until positive, and used from one to five days following positivity.
2. If the tube is a Day 1 or Day 2 positive, proceed to “Inoculation Procedure for Susceptibility Test.”

- If the tube is a Day 3, Day 4, or Day 5 positive, then dilute 1 mL of the positive broth in 4 mL of sterile saline (1:5 dilution). Use the diluted suspension for the inoculation procedures. Proceed to "Inoculation Procedure for Susceptibility Test."

PROCEDURE

Materials Provided: BACTEC MGIT 960 SIRE Kit containing one vial each lyophilized drug and eight vials of SIRE Supplement (approximately 40 tests per drug per kit). BACTEC MGIT 960 STR 4.0 Kit containing one vial lyophilized drug and two vials of SIRE Supplement (approximately 20 tests per kit), BACTEC MGIT 960 INH 0.4 Kit containing one vial lyophilized drug and two vials of SIRE Supplement (approximately 20 tests per kit), and BACTEC MGIT 960 EMB 7.5 Kit containing one vial lyophilized drug and two vials of SIRE Supplement (approximately 20 tests per kit).

Materials Required But Not Provided: BBL MGIT 7 mL Mycobacteria Growth Indicator Tubes, ancillary culture media, reagents, quality control organisms and laboratory equipment as required for this procedure.

Inoculation Procedure for BACTEC MGIT 960 SIRE Kit Susceptibility Test:

- Label five 7 mL MGIT tubes for each test isolate. Label one as GC (Growth Control), one as STR, one as INH, one as RIF, and the last as EMB. Place the tubes in the correct sequence in the appropriate size AST set carrier (see BACTEC MGIT Instrument User's Manual).
- Aseptically add 0.8 mL of BACTEC MGIT SIRE Supplement to each tube. NOTE: It is important to use the correct supplement.
- Aseptically pipet, using a micropipet, 100 µL of 83 µg/mL MGIT STR solution to the appropriately labeled MGIT tube. Aseptically pipet 100 µL of 8.3 µg/mL MGIT INH solution to the appropriately labeled MGIT tube. Aseptically pipet 100 µL of 83 µg/mL MGIT RIF solution to the appropriately labeled MGIT tube. Aseptically pipet 100 µL of 415 µg/mL MGIT EMB solution to the appropriately labeled MGIT tube. No drug solutions should be added to the MGIT GC tube.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution**	Volume Added to MGIT Tubes for Test	Final Concentration in MGIT Tubes
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1.0* µg/mL
MGIT INH	8.3 µg/mL	100 µL	0.1* µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1.0* µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5.0* µg/mL

*Equivalent to CDC⁴ recommended critical drug concentrations.

** These drugs must be reconstituted using 4 mL sterile/deionized water to achieve concentrations indicated.

- Growth Control tube preparation and inoculation:** Aseptically pipet 0.1 mL of the organism suspension (see "Specimen Preparation") into 10 mL of sterile saline to prepare the 1:100 Growth Control suspension. Mix the Growth Control suspension thoroughly. Inoculate 0.5 mL of the 1:100 Growth Control suspension into the MGIT tube labeled "GC."
- Drug-containing tube inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the organism suspension (see "Specimen Preparation") into each of the FOUR remaining drug tubes (STR, INH, RIF, EMB).
- Tightly recap the tubes and mix well.
- Enter the AST set into the BACTEC MGIT 960 SIRE Kit using the AST set entry feature (refer to the BACTEC MGIT Instrument User's Manual). Ensure that the order of the tubes in the AST Set Carrier conforms to the Set Carrier definitions selected when performing the AST set entry feature.
- Streak 0.1 mL of the organism suspension to a **Trypticase™** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plate. Enclose in a plastic bag. Incubate at 35 – 37°C.
- Check the blood agar plate at 48 h for bacterial contamination. If the blood agar plate shows no growth, then allow AST testing to proceed. If the blood agar plate shows growth, discard the AST set (refer to the BACTEC MGIT Instrument User's Manual) and repeat testing with pure culture.

Inoculation Procedure for BACTEC MGIT 960 STR 4.0, INH 0.4 and EMB 7.5 Kits Susceptibility Test:

If resistance occurs at the critical concentration, an optional profile test may be performed which, at minimum, tests the high concentration of the drug to which it was originally resistant:

Isolate Source: The isolate used for this testing must have been prepared as described in "Specimen Preparation." A seed tube may be prepared from the drug free Growth Control tube

from the previously tested AST set of the isolate, from which 0.5 mL may be inoculated to a fresh **MGIT** 7 mL tube containing **BACTEC MGIT** Growth Supplement. Once the seed tube is instrument positive, proceed as described in “Specimen Preparation: Preparation from a Positive **MGIT** tube.”

1. Label enough **MGIT** 7 mL tubes for the test isolate to have a **MGIT** GC (Growth Control) and a **MGIT** drug tube for each antimicrobial tested.
2. Aseptically add 0.8 mL of **BACTEC MGIT** SIRE Supplement to each tube. NOTE: it is important to use the correct supplement.
3. Aseptically pipet, using a micropipet, 100 µL of the drug solution to the appropriately labeled **MGIT** tube. No antibiotics should be added to the **MGIT** GC tube.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution**	Volume Added to MGIT Tubes for Test	Final Concentration in MGIT Tubes
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4.0* µg/mL
MGIT INH 0.4	33.2 µg/mL	100 µL	0.4* µg/mL
MGIT EMB 7.5	622.5 µg/mL	100 µL	7.5* µg/mL

* Equivalent to MOP high drug concentrations.⁴

** These drugs must be reconstituted using 2 mL sterile/deionized water to achieve concentrations indicated.

4. **Growth Control tube preparation and inoculation:** Aseptically pipet 0.1 mL of the organism suspension (see “Specimen Preparation”) into 10 mL of sterile saline to prepare the 1:100 Growth Control suspension. Mix the Growth Control suspension thoroughly. Inoculate 0.5 mL of the 1:100 Growth Control suspension into the **MGIT** tube labeled “GC.”
5. **Drug-containing tube inoculation:** Aseptically pipet 0.5 mL of the organism suspension (see “Specimen Preparation”) into each of the drug tubes.
6. Tightly recap the tubes and mix well.
7. Enter the AST set into the **BACTEC MGIT** instrument using the AST set entry feature (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User’s Manual). Ensure that the order of the tubes in the AST Set Carrier conforms to the Set Carrier definitions selected when performing the AST set entry feature.
8. Streak 0.1 mL of the organism suspension to a **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) plate. Enclose in a plastic bag. Incubate at 35 – 37°C.
9. Check the blood agar plate at 48 h for bacterial contamination. If the blood agar plate shows no growth, then allow AST testing to proceed. If the blood agar plate shows growth, discard the AST set (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User’s Manual) and repeat testing with pure culture.

NOTE: The susceptibility test may be configured in a variety of formats. For example, a five tube carrier set containing only the critical concentrations can be configured into the system. A variety of other tube carrier sets can be configured depending on the optional profile tests being run (refer to **BACTEC MGIT** Instrument User’s manual).

User Quality Control: Upon receipt of a new shipment or lot number of **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit vials, it is suggested that the control organism shown below be tested (see “Inoculation Procedure for Susceptibility Test”). Observation of the proper results, as shown below, within 4 – 13 days indicates that the **BACTEC MGIT** 960 SIRE Kit is ready for use in testing patient isolates. If the proper results are not observed, repeat the test. If, after repeating the test, the proper results are still not observed, do not use the product until you have contacted Technical Services at (800) 638-8663 (United States only).

The same control organism should be run as batch QC once each week when susceptibility testing is performed. If the batch QC fails, do not report patient results for the drug (s) that failed for that testing period. Repeat the QC for the drug(s) and patient isolates affected by the initial QC failure. If the repeat QC does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services at (800) 638-8663 (United States only).

Strains	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
<i>M. tuberculosis</i> ATCC™ 27294	Positive	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Susceptible

Strains	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4	MGIT EMB 7.5
<i>M. tuberculosis</i> ATCC™ 27294	Positive	Susceptible	Susceptible	Susceptible

REPORTING OF RESULTS

The **BACTEC MGIT** instrument will monitor susceptibility test sets until a susceptible or resistant determination is made. Once the set testing is completed, the results are reported by the **BACTEC MGIT** instrument (refer to the **BACTEC MGIT** Instrument User's Manual).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Suspensions made from solid media must be allowed to settle for the prescribed times prior to standardization. Inoculum preparations made from solid media without the use of a 0.5 McFarland turbidity standard and the appropriate dilutions may give inaccurate results.

Use only pure cultures of *M. tuberculosis*. Cultures which are contaminated or which contain multiple strains of mycobacteria may give erroneous results.

Failure to reconstitute the drugs with the appropriate volume of sterile deionized water may give inaccurate results.

Failure to use a 1:100 dilution of the isolate for the inoculation of the Growth Control tube may give inaccurate results.

Failure to load the tubes of the AST set into the AST Set Carrier in the proper sequence may give inaccurate results.

Failure to use the SIRE Supplement in the AST set may give inaccurate results. Do not add **BACTEC MGIT** Growth Supplement to the AST set.

EXPECTED VALUES

See addendum

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

See addendum

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
245123	BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit, carton of 4 lyophilized drug vials, and 8 SIRE Supplements.
245125	BACTEC™ MGIT™ 960 STR 4.0 Kit, carton of 1 lyophilized drug vial and 2 SIRE Supplements.
245126	BACTEC™ MGIT™ 960 INH 0.4 Kit, carton of 1 lyophilized drug vial and 2 SIRE Supplements.
245127	BACTEC™ MGIT™ 960 EMB 7.5 Kit, carton of 1 lyophilized drug vial and 2 SIRE Supplements.

REFERENCES

1. Barenfanger, J. 1993. Making your lab safe against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Newsl. 15: 76-80.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Approved Standard: M24-A. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. CLSI, Wayne, Pa.
3. BD Diagnostic Systems. **BACTEC™** 460TB System Product and Procedure Manual.
4. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
5. Data on file at BD Diagnostic Systems.

BD Trousse BACTEC MGIT 960 SIRE Pour la détection de la sensibilité aux antimycobactériens de *Mycobacterium tuberculosis*

Français

APPLICATION

La trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** sert de test de détection qualitative rapide de la résistance de souches de *Mycobacterium tuberculosis* à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol ; le test se fait à partir d'une culture au moyen des systèmes **BACTEC MGIT 960** et **BACTEC MGIT 320**.

RESUME ET EXPLICATION

La détection de la sensibilité aux antimycobactériens est cruciale pour un traitement adéquat des patients atteints de tuberculose. Le traitement de la tuberculose est effectué en général au moyen d'une polychimiothérapie constituée des antituberculeux suivants : la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine et/ou l'éthambutol. Il est important que les antituberculeux prescrits démontrent une activité spécifique contre *Mycobacterium tuberculosis* vérifiée par la sensibilité de l'isolat à ces antituberculeux.

Les souches multirésistantes de *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) sont récemment devenues un problème de santé publique sérieux.¹ La résistance à la streptomycine (STR), à l'isoniazide (INH), à la rifampicine (RIF) et à l'éthambutol (EMB), les quatre médicaments les plus efficaces, rend la maladie plus difficile et plus chère à traiter. La détection rapide de ces souches est essentielle au traitement efficace d'un patient.

Deux méthodes ont été largement utilisées pour la détection d'une sensibilité aux antituberculeux. La première méthode, connue sous le nom de Méthode des Proportions,² utilise des géloses Middlebrook et Cohn 7H10. Elle compare le nombre de colonies sur géloses contenant l'antibiotique à celui obtenu sur milieux sans antibiotique. La résistance à un antibiotique est détectée lorsque 1 % ou plus d'une population bactérienne est résistante à la concentration d'antibiotique testé. Les résultats sont généralement disponibles après 21 jours d'incubation. La seconde méthode, connue sous le nom de méthode radiométrique de sensibilité **BACTEC 460TB**,³ prend généralement de 4 à 12 jours. Elle est basée sur la production de dioxyde de carbone radio-marqué au ¹⁴C lors de la croissance des mycobactéries telle qu'indiquée par une augmentation de l'index de croissance dans le système.

Historiquement, la Méthode des Proportions (MOP) a consisté en la détection de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* au moyen de deux concentrations d'antimicrobiens. Le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) continue à recommander l'emploi de deux concentrations pour tester la sensibilité aux principaux antibiotiques sauf la rifampicine par la Méthode des Proportions. Les basses concentrations recommandées pour cette méthode correspondent en général aux concentrations critiques de ces antibiotiques. La concentration critique est définie comme la concentration de l'antibiotique qui inhibe le développement d'une sous-population du type sauvage tout en permettant une croissance suffisante de la sous-population mutante résistante pour en assurer la détermination de la résistance au seuil critique de 1 %. La forte concentration de l'antibiotique n'est pas considérée être la concentration critique. La résistance à la forte concentration sert toutefois à démontrer que la résistance est généralement distribuée au sein de la population de la souche de *M. tuberculosis* testée. Certains cliniciens utilisent les résultats du test de sensibilité aux fortes concentrations pour établir le profil du niveau de résistance de la souche testée.

Le test **BACTEC MGIT 960 SIRE** donne des résultats de sensibilité dans approximativement les mêmes délais que le système **BACTEC 460TB**. De plus, cette méthode n'utilise pas de radio-isotope et permet d'obtenir des résultats de tests de sensibilité appropriés plus tôt, en général, qu'avec la Méthode des Proportions.

Le système **BACTEC MGIT** a été mis au point afin de permettre l'évaluation de la sensibilité à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine et l'éthambutol aux concentrations critiques, et à une concentration plus élevée pour la streptomycine, l'isoniazide et l'éthambutol. Ces concentrations correspondent aux deux concentrations utilisées dans la méthode MOP. Un résultat de sensible à la concentration critique peut être donné et aucun autre test ne s'avère nécessaire. Mais, toute souche trouvée résistante à la streptomycine, l'isoniazide et l'éthambutol à la concentration critique par la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** peut, au minimum, être testée à la forte concentration. Dans ce cas, un résultat final de résistance à la concentration critique peut être donné avec en note que le test supplémentaire à la forte concentration est en cours.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le tube **BBL MGIT 7 mL** avec indicateur de croissance mycobactérienne est un tube contenant un Bouillon Middlebrook 7H9 modifié qui supporte la croissance et la détection des mycobactéries (cf. la notice des produits **BBL MGIT 7 mL**). Le tube **MGIT** contient un composé fluorescent incorporé à de la silicone au fond de tubes de 16 x 100 mm à fond rond. Le composé fluorescent est sensible à la présence d'oxygène dissous dans le bouillon. Initialement, la concentration d'oxygène dissous inhibe l'émission du composé et peu de fluorescence peut être détectée. Subséquemment, les microorganismes, en respirant, consomment l'oxygène du milieu et permettent à la fluorescence de s'exprimer.

La trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** est un test qualitatif de 4 – 13 jours. Le test est basé sur la comparaison entre la croissance d'un isolat de *Mycobacterium tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique et celle obtenue dans un tube sans antibiotique (contrôle de croissance). L'instrument **BACTEC MGIT** surveille les tubes à la recherche de toute augmentation de fluorescence. L'instrument compare la fluorescence du tube contenant l'antibiotique à celle du tube de contrôle de croissance pour établir les résultats de sensibilité. L'instrument **BACTEC MGIT** interprète automatiquement les résultats au moyen d'algorithmes prédéfinis (qui comparent la croissance dans le tube contenant l'antibiotique à la croissance dans le tube de contrôle de croissance) et le résultat de sensible ou résistant est alors donné par l'instrument.

REACTIFS

La trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** contient une ampoule lyophilisée respectivement de streptomycine, d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol et huit ampoules de supplément SIRE.

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : streptomycine (STR) ..332 µg

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : isoniazide (INH)33,2 µg

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : rifampicine (RIF)332 µg

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : éthambutol (EMB)...1660 µg

La trousse **BACTEC MGIT STR 4.0** contient une ampoule lyophilisée de streptomycine et deux de supplément SIRE.

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : streptomycine.....664 µg

La trousse **BACTEC MGIT INH 0.4** contient une ampoule lyophilisée d'isoniazide et deux de supplément SIRE.

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : isoniazide.....66,4 µg

La trousse **BACTEC MGIT EMB 7.5** contient une ampoule lyophilisée d'éthambutol et deux de supplément SIRE.

Formule approximative* par ampoule d'antibiotique lyophilisé : éthambutol.....1245 µg

Le supplément **BACTEC MGIT 960 SIRE** contient 20 mL de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC

Formule approximative par* L d'eau purifiée

Albumine bovine50,0 g Catalase0,03 g

Dextrose20,0 g Acide oléique0,6 g

*Modifiée et/ou complétée comme nécessaire pour satisfaire les critères de performance.

Conservation et reconstitution des réactifs : ampoules d'antibiotique **MGIT 960 SIRE** – dès réception, conserver les ampoules lyophilisées à 2 – 8 °C. Une fois reconstituées, les solutions d'antibiotique peuvent être congelées et conservées à -20 °C ou plus froid jusqu'à 6 mois, sans dépasser la date de péremption originale. Une fois décongelées, les solutions doivent être utilisées immédiatement. Jeter les portions non utilisées.

Supplément **MGIT SIRE** – dès réception, conserver à l'obscurité à 2 – 8 °C. Eviter toute congélation ou chaleur excessive. Ouvrir et utiliser avant la date de péremption. Minimiser l'exposition à la lumière.

Mode d'emploi :

Reconstituer chaque ampoule de streptomycine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 83 µg/mL.

Reconstituer chaque ampoule d'isoniazide lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 8,3 µg/mL.

Reconstituer chaque ampoule de rifampicine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 83 µg/mL.

Reconstituer chaque ampoule d'éthambutol lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** avec **4 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 415 µg/mL.

NOTA : les antibiotiques suivants sont reconstitués pour un volume différent. Manquer d'utiliser le volume approprié d'eau distillée stérile pour la reconstitution des antibiotiques à la plus forte concentration rendra nuls les résultats des tests de sensibilité obtenus avec ces antibiotiques.

Reconstituer chaque ampoule de streptomycine lyophilisée de la trousse **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** avec **2 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 332 µg/mL.

Reconstituer chaque ampoule d'isoniazide lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** avec **2 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 33,2 µg/mL.

Reconstituer chaque ampoule d'éthambutol lyophilisé de la trousse **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** avec **2 mL** d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution stock de 622,5 µg/mL.

AVERTISSEMENTS :

Pour le diagnostic *in vitro*.

ECHANTILLON A TESTER POTENTIELLEMENT INFECTIEUX : observer toutes les "Précautions Universelles"⁴ et les directives de votre institution lors de la manipulation et l'élimination de matériaux infectieux.

Travailler avec des cultures de *M. tuberculosis* nécessite des pratiques de sécurité de niveau 3 (BSL), des équipements et des installations de contention.

Lire et suivre les instructions contenues dans toutes les notices appropriées incluant celle des Tubes avec indicateur de croissance mycobactérienne **BBL MGIT 7 mL**.

Avant utilisation il convient d'examiner les tubes et les ampoules pour rechercher des signes de contamination ou de détérioration. Jeter tout tube ou ampoule apparaissant suspect ou dont les tubes **MGIT** présentent une fluorescence avant utilisation.

Dans le cas où un tube est cassé : 1) Fermer les tiroirs de l'instrument ; 2) Eteindre l'instrument ; 3) Vider les lieux immédiatement ; 4) Consulter les directives de votre institution/CDC. Un tube inoculé, cassé ou qui fuit peut produire un aérosol de mycobactéries ; il faut appliquer des techniques de manipulations appropriées.

Passer à l'autoclave tous les tubes **MGIT** avant de les jeter.

PREPARATION des échantillons

Toutes les préparations détaillées ci-dessous sont faites à partir de cultures de *Mycobacterium tuberculosis*. Le laboratoire doit confirmer au moyen de techniques d'identification appropriées que l'isolat à tester est une culture pure.

Préparation de l'isolat à partir d'un milieu solide :

1. Ajouter 4 mL de Bouillon **BBL Middlebrook 7H9** (ou bouillon **BBL MGIT**) à un tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon, contenant 8 – 10 billes de verre.
2. A l'aide d'une anse bactériologique stérile, racler la surface d'une culture vieille de 14 jours au maximum, afin de récolter le plus de colonies possible tout en prenant soin de ne prélever aucun milieu solide. Suspendre les colonies dans le Bouillon Middlebrook 7H9. La turbidité de la suspension doit excéder le standard McFarland 1,0.
3. Agiter la suspension au vortex pendant 2 – 3 min afin de briser les gros agrégats.
4. Laisser reposer la suspension pendant 20 min sans la déranger.
5. Transférer le surnageant liquide dans un autre tube stérile de 16,5 x 128 mm avec capuchon (éviter de transférer tout sédiment) et laisser reposer à nouveau 15 min.
6. Transférer le surnageant liquide (il devrait être fluide, exempt de tout agrégat) dans un troisième tube stérile de 16,5 x 128 mm.
7. Ajuster la suspension à une turbidité équivalente au standard McFarland 0,5 en la comparant visuellement à un standard de turbidité McFarland 0,5.
8. Diluer 1,0 mL de la suspension ajustée dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5).

Préparation à partir d'un tube BACTEC MGIT positif :

1. Pour la préparation de l'inoculum pour le test, un tube **MGIT 7 mL** positif doit être utilisé le jour **après** celui où il est devenu positif dans l'instrument **BACTEC MGIT** (Jour 1) et au plus dans les cinq jours (Jour 5) après cette première apparition de la positivité. Un tube positif depuis plus de cinq jours doit être repiqué dans un nouveau tube **MGIT 7 mL** contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT** et testé sur l'instrument **BACTEC MGIT** jusqu'à ce qu'il devienne positif, et utilisé dans les un à cinq jours suivant l'apparition de la positivité.
2. Si le tube est un positif depuis le Jour 1 ou 2, aller à la rubrique "Méthode d'inoculation pour le test de sensibilité".
3. Si le tube est un positif depuis le Jour 3, 4 ou 5, diluer 1 mL de bouillon positif dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Utiliser la suspension diluée pour les procédures d'inoculation. Aller à la rubrique "Méthode d'inoculation pour le test de sensibilité."

METHODE

Matériel fourni : trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** contenant une ampoule lyophilisée de chaque antibiotique et huit ampoules de supplément SIRE (environ 40 tests par antibiotique par trousse). La trousse **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** contenant une ampoule lyophilisée de l'antibiotique et deux ampoules de supplément SIRE (environ 20 tests par trousse), la trousse **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** contenant une ampoule lyophilisée de l'antibiotique et deux ampoules de supplément SIRE (environ 20 tests par trousse) et la trousse **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** contenant une ampoule lyophilisée de l'antibiotique et deux ampoules de supplément SIRE (environ 20 tests par trousse).

Matériel non-fourni : les tubes **BBL MGIT 7 mL** avec indicateur de croissance mycobactérienne, les milieux de culture ancillaires, les réactifs, les organismes de contrôle de qualité et l'équipement de laboratoire nécessaires à cette procédure.

Méthode d'inoculation pour le test de sensibilité avec la trousse BACTEC MGIT 960 SIRE :

1. Etiqueter cinq tubes **MGIT 7 mL** pour chaque isolat à tester. Etiqueter un tube GC (Contrôle de Croissance), un STR, un INH, un RIF et le dernier EMB. Placer les tubes dans l'ordre dans le portoir de l'ensemble AST de la taille appropriée (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).
2. Ajouter de manière aseptique 0,8 mL de supplément **BACTEC MGIT SIRE** à chaque tube.
NOTA : il est important d'utiliser le supplément approprié.

3. Pipeter de manière aseptique à l'aide d'une micropipette, 100 µL de la solution stock à 83 µg/mL de **MGIT STR** dans le tube **MGIT** ayant l'étiquette appropriée. Pipeter de manière aseptique 100 µL de la solution stock à 8,3 µg/mL de **MGIT INH** dans le tube **MGIT** ayant l'étiquette appropriée. Pipeter de manière aseptique 100 µL de la solution stock à 83 µg/mL de **MGIT RIF** dans le tube **MGIT** ayant l'étiquette appropriée. Pipeter de manière aseptique 100 µL de la solution stock à 415 µg/mL de **MGIT EMB** dans le tube **MGIT** à l'étiquette appropriée. Il ne faut ajouter aucun antibiotique dans le tube **MGIT GC**.

Antibiotique	Concentration de l'antibiotique après reconstitution**	Volume ajouté aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1* µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* µg/mL*Équivalent aux concentrations critiques d'antibiotique recommandées par le CDC ⁴.

**Ces antibiotiques doivent être reconstitués au moyen de 4 mL d'eau distillée/désionisée afin d'obtenir les concentrations indiquées.

4. **Préparation et inoculation des tubes de contrôle de croissance** : pipeter de manière aseptique 0,1 mL de la suspension d'organisme (cf. « Préparation des échantillons ») dans 10 mL de sérum physiologique afin de préparer une suspension de contrôle de croissance au 1:100. Mélanger la solution de contrôle de croissance soigneusement. Inoculer **0,5 mL** d'une suspension de contrôle de croissance dans le tube **MGIT** étiqueté "GC".
5. **Inoculation de tube contenant des antibiotiques** : pipeter de manière aseptique 0,5 mL de la suspension d'organisme (cf. "Préparation des échantillons") dans chacun des QUATRE tubes d'antibiotique restants, à savoir **STR, INH, RIF, EMB**.
6. Bien refermer les tubes avec les capuchons et bien mélanger.
7. Entrer l'ensemble **AST** dans la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** grâce à la fonction d'entrée de l'ensemble **AST** (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). S'assurer que l'ordre des tubes dans le portoir de l'ensemble **AST** est conforme aux définitions du portoir de l'ensemble choisies lors de l'exécution de la fonction d'entrée de l'ensemble **AST**.
8. Strier 0,1 mL de la suspension d'organisme sur une gélose **Trypticase soja** avec 5 % de sang de mouton (**TSA II**) en boîte de Pétri. L'enfermer dans un sac plastique. Incuber à 35 – 37 °C.
9. Inspecter la gélose au sang au bout de 48 h à la recherche de contamination bactérienne. Si la gélose au sang ne présente aucun développement bactérien, laisser alors le test **AST** s'opérer. Si la gélose au sang présente un développement bactérien, jeter l'ensemble **AST** (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**) et répéter le test avec une culture pure.

Méthode d'inoculation pour le test de sensibilité avec les trousse **BACTEC MGIT 960 STR 4.0, INH 0.4 et EMB 7.5** :

Si la résistance apparaît à une concentration critique, vous pouvez effectuer un test facultatif de profil qui teste, au minimum, la forte concentration de l'antibiotique pour lequel la résistance a été observée à l'origine :

Source de l'isolat : l'isolat utilisé pour ce test doit avoir été préparé comme décrit dans "Préparation des échantillons." Un tube d'ensemencement peut être préparé à partir du tube de contrôle de croissance dépourvu d'antibiotique de l'ensemble **AST** précédemment testé pour cet isolat, dont 0,5 mL peuvent être inoculés dans un nouveau tube **MGIT 7 mL** contenant le supplément de croissance **BACTEC MGIT**. Une fois que le tube ensemencé est positif d'après l'instrument, procéder comme décrit dans "Préparation des échantillons : préparation à partir d'un tube **MGIT** positif."

1. Etiqueter suffisamment de tubes **MGIT 7 mL** pour que l'isolat à tester ait un tube **MGIT GC** (contrôle de croissance) et un tube **MGIT** d'antibiotique pour chaque antibiotique testé.
2. Ajouter de manière aseptique 0,8 mL de supplément **BACTEC MGIT SIRE** à chaque tube. **NOTA** : il est important d'utiliser le supplément approprié.
3. Pipeter de manière aseptique avec une micropipette 100 µL de la solution d'antibiotique dans le tube **MGIT** ayant la bonne étiquette. Il ne faut ajouter aucun antibiotique dans le tube **MGIT GC**.

Antibiotique	Concentration de l'antibiotique après reconstitution**	Volume ajouté aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0* µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4* µg/mL
MGIT EMB 7.5	622,5 µg/mL	100 µL	7,5* µg/mL

*Équivalent aux fortes concentrations de MOP.⁴

**Ces antibiotiques doivent être reconstitués avec 2 mL d'eau stérile/désionisée pour obtenir les concentrations indiquées.

- Préparation et inoculation du tube de contrôle de croissance** : pipeter de manière aseptique 0,1 mL de la suspension d'organisme (cf. "Préparation des échantillons") dans 10 mL de sérum physiologique stérile pour préparer la suspension de contrôle de croissance à 1:100. Mélanger la suspension de contrôle de croissance soigneusement. Inoculer 0,5 mL de la suspension de contrôle de croissance 1:100 dans le tube **MGIT** étiqueté "GC."
- Inoculation du tube d'antibiotique** : pipeter de manière aseptique 0,5 mL de la suspension d'organisme (cf. "Préparation des échantillons") dans chacun des tubes d'antibiotique.
- Bien refermer les tubes avec les capuchons et bien mélanger.
- Entrer l'ensemble **AST** dans l'instrument **BACTEC MGIT** au moyen de la fonction d'entrée de l'ensemble **AST** (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**). S'assurer que l'ordre des tubes dans le portoir de l'ensemble **AST** est conforme aux définitions du portoir de l'ensemble choisies lors de l'exécution de la fonction d'entrée de l'ensemble **AST**.
- Strier 0,1 mL de la suspension d'organismes sur une gélose de **Trypticase** soja additionnée de 5 % de sang de mouton (TSA II) en boîte de pétri. L'enfermer dans un sac de plastique fermé. Incuber à 35 – 37 °C.
- Inspecter la gélose au sang au bout de 48 h à la recherche de contamination bactérienne. Si la gélose au sang ne présente aucun développement bactérien, laisser alors le test **AST** s'opérer. Si la gélose au sang présente un développement bactérien, jeter l'ensemble **AST** (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**) et répéter le test avec une culture pure.

NOTA : le test de sensibilité peut être configuré suivant toute une gamme de formats. Par exemple, un ensemble portoir de 5 tubes ne contenant que les concentrations critiques peut être configuré dans le système. Toute une gamme d'ensembles portoirs de tube peut être configurée en fonction des tests facultatifs de profil en cours d'exécution (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).

Contrôle de qualité réalisé par l'utilisateur : dès réception d'un nouvel arrivage ou d'un nouveau numéro de lot d'ampoules de trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE**, il est suggéré que l'organisme de contrôle cité ci-dessous soit testé (cf. "Méthode d'inoculation pour le test de sensibilité"). L'obtention des résultats appropriés, donnés ci-dessous, dans les 4 – 13 jours signifie que la trousse **BACTEC MGIT 960 SIRE** est prête à être utilisée pour tester des isolats provenant de patients. Répéter le test si les résultats appropriés ne sont pas obtenus. Si après répétition du test les résultats appropriés ne sont toujours pas obtenus, n'utilisez pas le milieu jusqu'à ce que vous ayez contacté le représentant local de Becton Dickinson.

Le même organisme de contrôle doit être testé comme contrôle de qualité de lot une fois chaque semaine où le test de sensibilité est effectué. Si le contrôle de qualité du lot échoue, ne pas donner les résultats pour le patient pour le(s) antibiotique(s) dont le test a échoué pour la période considérée. Répéter le contrôle de qualité pour le(s) antibiotique(s) et les isolats de patient affectés par l'échec du contrôle de qualité original. Si la répétition du contrôle de qualité ne donne pas les résultats escomptés, ne pas donner les résultats pour le patient. N'utilisez pas le produit tant que vous n'avez pas contacté le représentant local de Becton Dickinson.

Souches	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Résultats positifs	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Souches	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4	MGIT EMB 7.5
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Résultats positifs	Sensible	Sensible	Sensible

COMPTE RENDU DES RESULTATS

L'instrument **BACTEC MGIT** surveille les ensembles de tests de sensibilité jusqu'à ce que la détermination de sensible ou résistant soit faite. Une fois que le test est achevé, les résultats sont donnés par l'instrument **BACTEC MGIT**. (se reporter au Manuel d'utilisation de l'instrument **BACTEC MGIT**).

LIMITES DE LA METHODE

Il faut laisser reposer les suspensions dérivées à partir de milieux solides pendant les temps prescrits avant la normalisation. Les préparations d'inoculum réalisées à partir de milieux solides sans user du standard de turbidité McFarland 0,5 et des dilutions appropriées peuvent donner des résultats erronés.

Utiliser seulement des cultures pures de *M. tuberculosis*. Les cultures contaminées ou qui contiennent des souches multiples de mycobactéries peuvent donner des résultats erronés.

Manquer de reconstituer les antibiotiques avec les volumes adéquats d'eau stérile désionisée peut engendrer des résultats erronés.

Manquer d'utiliser une dilution au 1:100 de l'isolat pour inoculer le tube de contrôle de croissance peut entraîner des résultats erronés.

Manquer de charger les tubes de l'ensemble **AST** dans le portoir de l'ensemble **AST** dans le bon ordre peut entraîner des résultats erronés.

Manquer d'utiliser le supplément SIRE dans l'ensemble AST peut donner des résultats erronés. Ne pas ajouter le supplément de croissance **BACTEC MGIT** à l'ensemble AST.

VALEURS ESCOMPTEES

Voir addenda

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Voir addenda

MATERIEL DISPONIBLE

N°. cat.	Description
245123	Trousse BACTEC MGIT 960 SIRE , carton de 4 ampoules d'antibiotiques lyophilisés et de 8 suppléments SIRE.
245125	Trousse BACTEC MGIT 960 STR 4.0 , carton d'1 ampoule d'antibiotique lyophilisé et de 2 suppléments SIRE.
245126	Trousse BACTEC MGIT 960 INH 0.4 , carton d'1 ampoule d'antibiotique lyophilisé et de 2 suppléments SIRE.
245127	Trousse BACTEC MGIT 960 EMB 7.5 , carton d'1 ampoule d'antibiotique lyophilisé et de 2 suppléments SIRE.

BD BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit Zur Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* gegen Antituberkulotika

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit** wird mit dem **BACTEC MGIT 960-** und **BACTEC MGIT 320-**System verwendet und ist ein qualitatives Schnellverfahren zur Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* aus Kulturen gegen Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin und Ethambutol.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Zur ordnungsgemäßen Behandlung von Tuberkulose-Patienten sind Empfindlichkeitsprüfungen gegen Antituberkulotika erforderlich. Tuberkulose wird normalerweise mit einer Kombination von Antituberkulotika wie Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin und/oder Ethambutol behandelt. Dabei ist wichtig, daß die angewendeten Antituberkulotika eine ausreichende Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* aufweisen, d. h., das Bakterienisolat muß gegen das Arzneimittel empfindlich sein.

Mycobacterium tuberculosis mit Mehrfachresistenz (MDR-TB) hat sich in letzter Zeit zu einem schwerwiegenden öffentlichen Gesundheitsproblem entwickelt.¹ Resistenz gegen eines der vier Primärtherapeutika Streptomycin (STR), Isoniazid (INH), Rifampicin (RIF) und Ethambutol (EMB) erschwert die Behandlung der Erkrankung und führt zu höheren Kosten. Der schnelle Nachweis resistenter Stämme ist maßgebend für eine wirksame Behandlung des Patienten.

Zur Empfindlichkeitsprüfung von Mykobakterien finden zwei Methoden breite Anwendung. Bei der ersten Methode, als Verhältnismethode bekannt,² wird Agar nach Middlebrook und Cohn 7H10 verwendet. Dabei werden Koloniezahlen auf Medien mit und ohne Arzneimittel verglichen. Resistenz gegen ein Arzneimittel ist nachgewiesen, wenn mindestens 1 % der Bakterienpopulation gegen die im Test verwendete Arzneimittelkonzentration resistent ist. Ergebnisse liegen im allgemeinen nach 21-tägiger Inkubation vor. Die zweite Methode, als **BACTEC 460TB** radiometrische Empfindlichkeitsmethode bekannt,³ dauert normalerweise 4 bis 12 Tage. Diese Methode beruht auf der Produktion von radioaktivem ¹⁴C-markiertem Kohlendioxid durch die wachsenden Mykobakterien, was durch die Zunahme des Wachstumsindex im System angezeigt wird.

Bei der Verhältnismethode wird die Empfindlichkeitsprüfung von *Mycobacterium tuberculosis* herkömmlicherweise mit zwei Antibiotikakonzentrationen durchgeführt. Das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) empfiehlt weiterhin, bei Anwendung der Verhältnismethode zwei Konzentrationen der Primärarzneimittel (außer Rifampicin) zu verwenden. Die für die Verhältnismethode empfohlenen niedrigen Konzentrationen sind in der Regel die kritischen Konzentrationen der jeweiligen Arzneimittel. Die kritische Konzentration ist die Arzneimittelkonzentration, bei der das Wachstum der Wildtypen gehemmt wird, resistente Mutanten jedoch in einem ausreichenden Maß vermehrungsfähig sind, so daß die Resistenz beim kritischen Verhältnis von 1 % bestimmt werden kann. Die hohe Arzneimittelkonzentration wird nicht als kritische Konzentration betrachtet. Resistenz bei der hohen Konzentration belegt jedoch eine allgemein verbreitete Resistenz in der Population des getesteten *M. tuberculosis*-Stamms. Einige Kliniker ziehen die bei der hohen Konzentration erzielten Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung zur Erstellung eines Resistenzprofils des Teststamms heran.

Der **BACTEC MGIT 960 SIRE-Test** liefert die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung etwa im gleichen Zeitraum wie das **BACTEC 460TB-System**. Außerdem ist diese Methode nicht-

radiometrisch, und die Ergebnisse der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung können in den meisten Fällen früher als bei der Verhältnismethode berichtet werden.

Das **BACTEC MGIT**-System ermöglicht Empfindlichkeitsprüfungen bei der kritischen Konzentration mit Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin und Ethambutol sowie bei einer höheren Konzentration mit Streptomycin, Isoniazid und Ethambutol. Diese Konzentrationen stimmen mit den beiden Konzentrationen überein, die bei der Verhältnismethode verwendet werden. Wenn sich ein Isolat bei der kritischen Konzentration als "empfindlich" erweist, kann dieser Befund berichtet werden, und weitere Untersuchungen sind nicht erforderlich. Jeder Stamm, der im **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Test bei der kritischen Konzentration gegen Streptomycin, Isoniazid und Ethambutol resistent ist, kann jedoch zumindest bei der höheren Konzentration getestet werden. In diesem Fall kann der Befund als "resistent bei kritischer Konzentration" berichtet und ein Vermerk, daß eine zusätzliche Prüfung bei der höheren Konzentration durchgeführt wird, hinzugefügt werden.

VERFAHRENSPRINZIP

Das **BBL MGIT 7**-mL-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum enthält eine modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillon, die das Wachstum und den Nachweis von Mykobakterien fördert (siehe Packungsbeilage für das **BBL MGIT 7**-mL-Indikatorröhrchen). Das **MGIT**-Indikatorröhrchen ist ein 16 x 100 mm-Röhrchen, in dessen rundem Boden eine fluoreszierende Verbindung in Silikon eingebettet ist. Die fluoreszierende Verbindung spricht auf das Vorliegen von in der Bouillon aufgelöstem Sauerstoff an. Anfänglich ist nur wenig Fluoreszenz nachweisbar, da der aufgelöste Sauerstoff die Emissionen der Verbindung absorbiert. Später nehmen die aktiv respirierenden Mikroorganismen den Sauerstoff auf und ermöglichen die Fluoreszenz der Verbindung.

Das **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Testkit ist ein qualitativer Test, der 4-13 Tage dauert. Der Test basiert auf dem Vergleich des Wachstums eines *Mycobacterium tuberculosis*-Isolats in einem arzneimittelhaltigen gegenüber einem arzneimittelfreien Röhrchen (Wachstumskontrolle). Das **BACTEC MGIT**-Gerät kontrolliert die Röhrchen auf zunehmende Fluoreszenz. Die Empfindlichkeit bzw. Resistenz wird vom Gerät anhand einer Fluoreszenzanalyse im arzneimittelhaltigen Röhrchen im Vergleich zur Fluoreszenz im Wachstumskontrollröhrchen bestimmt.

Das **BACTEC MGIT**-Gerät wertet diese Ergebnisse mit Hilfe vorgegebener Algorithmen (wobei das Wachstum im arzneimittelhaltigen Röhrchen mit dem Wachstum im Kontrollröhrchen verglichen wird) automatisch aus und meldet das Ergebnis als "empfindlich" oder "resistent".

REAGENZIEN

Das **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Testkit enthält jeweils ein Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin, Isoniazid, Rifampicin und Ethambutol sowie acht Fläschchen SIRE-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Streptomycin (STR) 332 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Isoniazid (INH)..... 33,2 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Rifampicin (RIF) 332 µg

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Ethambutol (EMB)..... 1660 µg

Das **BACTEC MGIT STR 4.0**-Testkit enthält ein Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Streptomycin..... 664 µg

Das **BACTEC MGIT INH 0.4**-Testkit enthält ein Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Isoniazid 66,4 µg

Das **BACTEC MGIT EMB 7.5**-Testkit enthält ein Fläschchen lyophilisiertes Ethambutol und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung.

Ungefähre Zusammensetzung* pro Fläschchen lyophilisiertes Arzneimittel:
Ethambutol 1245 µg

Die **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Anreicherung enthält 20 mL Middlebrook OADC-Anreicherung

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertes Wasser

Rinderalbumin50,0 g Katalase 0,03 g

Dextrose20,0 g Ölsäure.....0,6 g

*Abgestimmt und/loder supplementiert auf die geforderten Testkriterien.

Aufbewahrung und Rekonstituierung der Reagenzien: **MGIT 960 SIRE**-Arzneimittelfläschchen – Fläschchen mit lyophilisiertem Arzneimittel nach Erhalt bei 2 – 8 °C aufbewahren.

Rekonstituierte Antibiotikallösungen können eingefroren und bei mindestens -20 °C bis zu sechs Monaten, jedoch nicht über das ursprüngliche Verfallsdatum hinaus aufbewahrt werden.

Aufgetaute Lösungen müssen sofort verwendet werden. Nicht verwendete Anteile verwerfen.

BACTEC MGIT SIRE-Anreicherung – Nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder erhitzen. Vor dem Verfallsdatum öffnen und verwenden. Vor Licht schützen.

Gebrauchsanleitung:

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin im **BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit** mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 83 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid im **BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit** mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 8,3 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Rifampicin im **BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit** mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 83 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Ethambutol im **BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit** mit **4 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 415 µg/mL herzustellen.

HINWEIS: Die folgenden Reagenzien werden mit einer anderen Wassermenge rekonstituiert. Wenn zur Rekonstituierung der höheren Arzneimittelkonzentrationen nicht die korrekte Menge sterilen destillierten Wassers verwendet wird, sind die Testergebnisse ungültig.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin im **BACTEC MGIT 960 STR 4.0-Testkit** mit **2 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 332 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid im **BACTEC MGIT 960 INH 0.4-Testkit** mit **2 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 33,2 µg/mL herzustellen.

Jedes Fläschchen lyophilisiertes Ethambutol im **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5- Testkit** mit **2 mL** sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser rekonstituieren, um eine Stammlösung von 622,5 µg/mL herzustellen.

WARNHINWEISE:

Zur *In-Vitro*-Diagnostik.

POTENTIELL INFEKTIÖSE TESTPROBE: Infektiöses Probenmaterial sollte unter Einhaltung "Allgemeiner Vorsichtsmaßnahmen"⁴ und der jeweils bestehenden Laborvorschriften gehandhabt und entsorgt werden.

Beim Umgang mit *M. tuberculosis*-Kulturen sind Laborpraktiken, Sicherheitsvorkehrungen und -anlagen der Biosicherheitsstufe 3 erforderlich.

Die Anleitungen in allen zutreffenden Packungsbeilagen, einschließlich des **BBL MGIT 7-mL-Indikatorröhrchens** für Mykobakterienwachstum, durchlesen und befolgen.

Röhrchen und Fläschchen vor Gebrauch auf Anzeichen von Kontamination oder Beschädigung untersuchen. Röhrchen oder Fläschchen, die unbrauchbar erscheinen, oder **MGIT-Röhrchen**, die vor der Verwendung Fluoreszenz aufweisen, sind zu verwerfen.

Beim Bruch eines Röhrchens: 1) Geräteschubladen schließen; 2) Gerät ausschalten; 3) betroffenen Bereich unverzüglich verlassen; 4) vom Labor empfohlene Maßnahmen ergreifen. Ein undichtes bzw. zerbrochenes inokuliertes Röhrchen kann ein Mykobakterien-Aerosol erzeugen; entsprechende Richtlinien zur Handhabung beachten.

Alle inokulierten **MGIT-Röhrchen** vor dem Verwerfen autoklavieren.

VORBEREITUNG DER PROBEN

Alle nachstehenden Vorbereitungsschritte beziehen sich auf Kulturen von *Mycobacterium tuberculosis*. Das jeweilige Labor muß anhand geeigneter Identifizierungsmethoden bestätigen, daß das zu testende Isolat eine Reinkultur ist.

Vorbereitung des Isolats aus festen Medien:

1. Ein steriles 16,5 x 128 mm-Röhrchen mit Kappe, das 8 – 10 Glasperlen enthält, mit 4 mL **BBL Middlebrook 7H9-Bouillon** (oder **BBL MGIT-Bouillon**) beschenken.
2. Von einer bis zu 14 Tage alten Kultur möglichst viele Kolonien mit einer sterilen Öse abschaben und dabei nach Möglichkeit kein festes Medium mitaufnehmen. Die Kolonien in der Middlebrook 7H9-Bouillon suspendieren. Die Suspension muß einen Trübungsstandard höher als 1,0 McFarland aufweisen.
3. Suspension 2 – 3 min in einem Vortexmischer mischen, um größere Klumpen aufzubrechen.
4. Suspension 20 min ungestört stehen lassen.
5. Den Überstand in ein weiteres steriles 16,5 x 128 mm-Röhrchen mit Kappe überführen (dabei Überführen des Sediments vermeiden) und weitere 15 min stehen lassen.
6. Den Überstand (der gleichmäßig aussehen und keine Klumpen enthalten sollte) in ein drittes steriles 16,5 x 128 mm-Röhrchen überführen.
7. Suspension mit einem Trübungsmesser auf einen Wert von 0,5 McFarland einstellen.
8. 1,0 mL der eingestellten Suspension in 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5 Verdünnung).

Vorbereitung aus einem positiven BACTEC MGIT-Röhrchen:

1. Zur Vorbereitung des Testinokulums sollte ein positives 7-mL-MGIT-Röhrchen vom ersten Tag nach dem Positivwerden im BACTEC MGIT-Gerät (Tag 1) bis einschließlich zum fünften Tag (Tag 5) verwendet werden. Von einem Röhrchen, das länger als fünf Tage positiv war, sollte eine Subkultur in einem neuen 7-mL-MGIT-Röhrchen mit BACTEC MGIT-Wachstumsanreicherung angelegt werden. Die Subkultur sollte dann im BACTEC MGIT-Gerät bis zum Positivwerden getestet und innerhalb von ein bis fünf Tagen nach Auftreten einer Positivität verwendet werden.
2. Wenn das Röhrchen an Tag 1 oder Tag 2 positiv ist, mit dem "Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung" fortfahren.
3. Wenn das Röhrchen an Tag 3, 4 oder 5 positiv wird, 1 mL der positiven Bouillon in 4 mL steriler Kochsalzlösung verdünnen (1:5 Verdünnung). Die verdünnte Suspension zur Inokulation verwenden. Mit dem "Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung" fortfahren.

VERFAHREN

Mittelgeliefertes Arbeitsmaterial: BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit mit je einem Fläschchen der lyophilisierten Arzneimittel sowie acht Fläschchen SIRE-Anreicherung (etwa 40 Tests pro Arzneimittel pro Testkit). BACTEC MGIT 960 STR 4.0-Testkit mit einem Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung (etwa 20 Tests pro Testkit), BACTEC MGIT 960 INH 0.4-Testkit mit einem Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung (etwa 20 Tests pro Testkit) und BACTEC MGIT 960 EMB 7.5-Testkit mit einem Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und zwei Fläschchen SIRE-Anreicherung (etwa 20 Tests pro Testkit).

Nicht mittelgeliefertes Arbeitsmaterial: BBL MGIT 7-mL-Indikatorröhrchen für Mykobakterienwachstum, zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und die für dieses Verfahren benötigten Laborutensilien.

Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung mit dem BACTEC MGIT 960 SIRE-Testkit:

1. Für jedes Testisolat fünf 7-mL-MGIT-Röhrchen beschriften. Ein Röhrchen mit WK (Wachstumskontrolle), eines mit STR, eines mit INH, eines mit RIF und das letzte mit EMB beschriften. Die Röhrchen in der richtigen Anordnung in einen AST-Röhrchenständer geeigneter Größe stellen (siehe BACTEC MGIT-Gerät Benutzerhandbuch).
2. Jedes Röhrchen aseptisch mit 0,8 mL BACTEC MGIT SIRE-Anreicherung beschriften. HINWEIS: Die Verwendung der richtigen Anreicherung ist wichtig.
3. Mit einer Mikropipette 100 µL der 83 µg/mL MGIT STR-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete MGIT-Röhrchen pipettieren. 100 µL der 8,3 µg/mL MGIT INH-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete MGIT-Röhrchen pipettieren. 100 µL der 83 µg/mL MGIT RIF-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete MGIT-Röhrchen pipettieren. 100 µL der 415 µg/mL MGIT EMB-Lösung aseptisch in das entsprechend gekennzeichnete MGIT-Röhrchen pipettieren. Dem MGIT GC-Röhrchen dürfen keine Antibiotika zugesetzt werden.

Arzneimittel	Arzneimittelkonzentration nach Rekonstituierung**	Den MGIT-Röhrchen zugegebene Volumina für den Test	Endkonzentrationen der MGIT-Röhrchen
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1* µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0* µg/mL

*Entspricht der von den CDC⁴ empfohlenen kritischen Arzneimittelkonzentration.

**Diese Arzneimittel müssen mit 4 mL sterilisiertem/deionisiertem Wasser rekonstituiert werden, um die angegebene Konzentration zu erzielen.

4. **Vorbereitung und Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens:** Zur Zubereitung der 1:100 Wachstumskontroll suspension 0,1 mL der Bakterien suspension (siehe "Vorbereitung der Proben") aseptisch in 10 mL sterile Kochsalzlösung pipettieren. Die Wachstumskontroll suspension gründlich durchmischen. Das mit "GC" beschriftete MGIT-Röhrchen mit 0,5 mL der 1:100 Wachstumskontroll suspension inokulieren.
5. **Inokulation der arzneimittelhaltigen Röhrchen:** 0,5 mL der Bakterien suspension (siehe "Vorbereitung der Proben") aseptisch in jedes der VIER verbleibenden Röhrchen (STR, INH, RIF, EMB) pipettieren.
6. Die Röhrchen wieder fest verschließen und gut durchmischen.
7. Den AST-Ansatz mit Hilfe der AST-Eingabefunktion in das BACTEC MGIT 960-Gerät eingeben (siehe BACTEC MGIT-Gerät Benutzerhandbuch). Sicherstellen, daß die Anordnung der Röhrchen im AST-Röhrchenständer mit der bei der Eingabe gewählten Konfiguration übereinstimmt.
8. 0,1 mL der Bakterien suspension auf einer Trypticase Soja-Agarplatte mit 5 % Schafblut (TSA II) ausstreichen. Platte in einen Plastikbeutel einschließen. Bei 35 – 37 °C inkubieren.
9. Die Blutagarplatte nach 48 h auf bakterielle Kontamination untersuchen. Wenn die Blutagarplatte kein Wachstum aufweist, die Empfindlichkeitsprüfung fortsetzen. Wenn die

Blutagarplatte Wachstum aufweist, den AST-Ansatz verwerfen (siehe **BACTEC MGIT**-Gerät Benutzerhandbuch) und den Test mit einer Reinkultur wiederholen.

Inokulationsverfahren für die Empfindlichkeitsprüfung mit den BACTEC MGIT 960 STR 4.0-, INH 0.4- und EMB 7.5-Testkits:

Wenn bei der kritischen Konzentration eine Resistenz nachgewiesen wird, kann ein optionaler Profilttest durchgeführt werden, bei dem geringstenfalls die hohe Konzentration des Arzneimittels geprüft wird, gegen das der Organismus ursprünglich resistent war:

Isolatquelle: Das für diesen Test verwendete Isolat muß nach den Anleitungen unter "Vorbereitung der Proben" zubereitet werden. Zur Zubereitung eines Inokulumröhrchens können 0,5 mL des Isolats aus dem arzneimittelfreien Wachstumskontrollröhrchen des zuvor getesteten AST-Ansatzes in ein neues 7-mL-MGIT-Röhrchen mit **BACTEC MGIT**-Wachstumsmedium überimpft werden. Wenn das Inokulumröhrchen im Gerät positiv ist, mit den Anleitungen unter "Vorbereitung der Proben: Vorbereitung aus einem positiven **BACTEC MGIT**-Röhrchen" fortfahren.

1. Eine ausreichende Anzahl von 7-mL-MGIT-Röhrchen für das Testisolat beschriften, so daß für jedes Antibiotikum ein **MGIT**-WK-Röhrchen und ein **MGIT**-Arzneimittlröhrchen zur Verfügung steht.
2. Jedes Röhrchen aseptisch mit 0,8 mL der **BACTEC MGIT** SIRE-Anreicherung beschriften. **HINWEIS:** die Verwendung der richtigen Anreicherung ist wichtig.
3. Mit einer Mikropipette 100 µL der Arzneimittel-Lösung aseptisch in das entsprechende gekennzeichnete **MGIT**-Röhrchen pipettieren. Dem **MGIT** GC-Röhrchen dürfen keine Antibiotika zugesetzt werden.

Arzneimittel	Arzneimittelkonzentration nach Rekonstituierung**	Den MGIT -Röhrchen zugegebene Volumina für den Test	Endkonzentrationen der MGIT -Röhrchen
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0* µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2 µg/mL	100 µL	0,4* µg/mL
MGIT EMB 7.5	622,5 µg/mL	100 µL	7,5* µg/mL

*Entspricht der hohen Arzneimittelkonzentration der Verhältnismethode.⁴

**Diese Arzneimittel müssen mit 2 mL sterilisiertem/deionisiertem Wasser rekonstituiert werden, um die angegebene Konzentration zu erzielen.

4. **Vorbereitung und Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens:** Zur Zubereitung der 1:100 Wachstumskontroll suspension 0,1 mL der Bakteriensuspension (siehe "Vorbereitung der Proben") in 10 mL sterile Kochsalzlösung pipettieren. Die Wachstumskontroll suspension gründlich durchmischen. Das mit "GC" beschriftete **MGIT**-Röhrchen mit 0,5 mL der 1:100 Wachstumskontroll suspension inokulieren.
5. **Inokulation der arzneimittelhaltigen Röhrchen:** 0,5 mL der Bakteriensuspension (siehe "Vorbereitung der Proben") aseptisch in jedes der arzneimittelhaltigen Röhrchen pipettieren.
6. Die Röhrchen wieder fest verschließen und gut durchmischen.
7. Den AST-Ansatz mit Hilfe der AST-Eingabefunktion in das **BACTEC MGIT**-Gerät eingeben (siehe **BACTEC MGIT**-Gerät Benutzerhandbuch). Sicherstellen, daß die Anordnung der Röhrchen im AST-Röhrchenständer mit der bei der Eingabe gewählten Konfiguration übereinstimmt.
8. 0,1 mL der Bakteriensuspension auf einer **Trypticase** Soja-Agarplatte mit 5 % Schaffblut (TSA II) ausstreichen. Platte in einen Plastikbeutel einschließen. Bei 35 – 37 °C inkubieren.
9. Die Blutagarplatte nach 48 h auf bakterielle Kontamination untersuchen. Wenn die Blutagarplatte kein Wachstum aufweist, die Empfindlichkeitsprüfung fortsetzen. Wenn die Blutagarplatte Wachstum aufweist, den AST-Ansatz verwerfen (siehe **BACTEC MGIT**-Gerät Benutzerhandbuch) und den Test mit einer Reinkultur wiederholen.

HINWEIS: Die Empfindlichkeitsprüfung kann in verschiedenen Formaten konfiguriert werden. So kann zum Beispiel ein Testansatz für einen Röhrchenständer mit 5 Röhrchen, die nur die kritischen Konzentrationen enthalten, im System konfiguriert werden. Abhängig von den durchgeführten optionalen Profilttests können Testansätze für verschiedene andere Röhrchenständer konfiguriert werden (siehe **BACTEC MGIT**-Gerät Benutzerhandbuch).

Qualitätskontrolle durch den Anwender: Es wird empfohlen, bei Erhalt einer neuen Sendung oder Chargennummer von **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Teströhrchen, den nachstehend aufgeführten Kontrollorganismus zu testen (siehe "Inokulationsverfahren für Empfindlichkeitsprüfung"). Wenn die nachstehend aufgeführten korrekten Ergebnisse innerhalb von 4 – 13 Tagen erzielt werden, kann das **BACTEC MGIT 960 SIRE**-Testkit zur Prüfung von Patientenisolaten verwendet werden. Sollten die korrekten Ergebnisse nicht erzielt werden, ist der Test zu wiederholen. Wenn die korrekten Ergebnisse nach nochmaligem Testen nicht erzielt werden, das Testkit nicht verwenden und eine Becton Dickinson Vertretung verständigen.

Der gleiche Kontrollorganismus sollte bei der Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen einmal wöchentlich als Qualitätskontrolle getestet werden. Wenn die Qualitätskontrolle scheitert, dürfen die in dieser Testperiode erzielten Patientenergebnisse für die betreffenden Arzneimittel nicht berichtet werden. Den Qualitätskontrolltest für die betreffenden Arzneimittel und Patientenisolats wiederholen. Wenn der Qualitätskontrolltest erneut scheitert, können die Patientenergebnisse nicht berichtet werden. Das Testkit nicht verwenden und eine Becton Dickinson Vertretung verständigen.

Stämme	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positivo	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich

Stämme	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4	MGIT EMB 7.5
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positivo	Empfindlich	Empfindlich	Empfindlich

AUSGABE DER ERGEBNISSE

Das **BACTEC MGIT**-Gerät kontrolliert AST-Ansätze, bis ein Isolat als "empfindlich" oder "resistent" beurteilt wird. Sobald die Ansätze durchgetestet sind, werden die Ergebnisse vom **BACTEC MGIT**-Gerät ausgegeben. (Siehe **BACTEC MGIT**-Gerät Benutzerhandbuch).

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Aus festen Medien zubereitete Suspensionen müssen sich vor der Standardisierung die vorgeschriebene Zeit absetzen. Inokula, die aus festen Medien ohne Einstellung auf einen Trübungsstandard von 0,5 McFarland und Verwendung der ordnungsgemäßen Verdünnungen zubereitet wurden, können zu falschen Ergebnissen führen.

Nur Reinkulturen von *M. tuberculosis* verwenden. Kontaminierte Kulturen oder Kulturen mit mehreren Stämmen von Mykobakterien können zu falschen Ergebnissen führen.

Arzneimittel, die nicht mit der korrekten Menge sterilisierten/deionisierten Wassers rekonstituiert werden, können zu falschen Ergebnissen führen.

Wenn zur Inokulation des Wachstumskontrollröhrchens keine 1:100 Verdünnung des Isolats verwendet wird, können falsche Ergebnisse erzielt werden.

Wenn die Röhrchen des AST-Ansatzes nicht in der richtigen Anordnung in den AST-Röhrchenständer gestellt werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden.

Wenn die SIRE-Anreicherung nicht im AST-Ansatz verwendet wird, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Einem AST-Ansatz darf keine **BACTEC MGIT**-Wachstumsanreicherung zugesetzt werden.

ERWARTETE WERTE

Siehe Nachtrag

LEISTUNGSMERKMALE

Siehe Nachtrag

Lieferbare Produkte

Best.-Nr.	Beschreibung
245123	BACTEC MGIT 960 SIRE -Testkit, Karton mit 4 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 8 Fläschchen SIRE-Anreicherung.
245125	BACTEC MGIT 960 STR 4.0 -Testkit, Karton mit 1 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 2 Fläschchen SIRE-Anreicherung.
245126	BACTEC MGIT 960 INH 0.4 -Testkit, Karton mit 1 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 2 Fläschchen SIRE-Anreicherung.
245127	BACTEC MGIT 960 EMB 7.5 -Testkit, Karton mit 1 Fläschchen lyophilisiertem Arzneimittel und 2 Fläschchen SIRE-Anreicherung.

BD Kit BACTEC MGIT 960 SIRE Per il test di sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis* agli agenti antimicobatterici

Italiano

USO PREVISTO

Il kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** è usato come procedura qualitativa rapida per il test di sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis*, in coltura, a streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo, mediante l'utilizzo dei sistemi **BACTEC MGIT 960** e **BACTEC MGIT 320**.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il test di sensibilità antimicobatterica è necessario per la terapia corretta di pazienti con tubercolosi. La terapia della tubercolosi si basa generalmente su un regime a più farmaci comprendente preparati antimicobatterici come streptomina, isoniazide, rifampicina e/o etambutolo. È importante che i farmaci antimicobatterici prescritti manifestino attività specifica per *Mycobacterium tuberculosis*, ossia che il ceppo isolato sia sensibile al farmaco.

Mycobacterium tuberculosis, multiresistente, (MDR-TB) è recentemente diventato un serio problema di sanità pubblica.¹ La possibile resistenza a uno dei quattro farmaci primari, streptomina (STR), isoniazide (INH), rifampicina (RIF) ed etambutolo (EMB), rende la malattia

ancora più difficile e costosa da curare, pertanto la rilevazione rapida di questi ceppi è essenziale ai fini della somministrazione di una terapia efficace.

I metodi più comunemente usati per il test di sensibilità agli agenti antimicrobici sono due. Il primo, conosciuto come Metodo della Proporzione,² usa Agar Middlebrook e Cohn 7H10 e confronta il numero di colonie presenti in terreni contenenti farmaci con quello di terreni senza farmaci. La resistenza ad un farmaco viene determinata in base alla resistenza dell'1% o più della popolazione batterica alla concentrazione del farmaco testato. In genere i risultati si ottengono dopo 21 giorni di incubazione. Il secondo metodo, noto come Metodo della sensibilità radiometrica **BACTEC 460TB**,³ richiede di solito da 4 a 12 giorni ed è basato sulla produzione di anidride carbonica ¹⁴C radioattiva da parte dei micobatteri in crescita. Tale produzione è evidenziata dall'aumento dell'indice di crescita nel sistema.

Storicamente, il Metodo della Proporzione (MOP) è consistito nella rilevazione della sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis* mediante l'impiego di due concentrazioni di antibiotici. Il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) consiglia tuttora di impiegare nella procedura di analisi MOP due concentrazioni dei farmaci primari, eccetto la rifampicina. Le concentrazioni basse consigliate per la procedura MOP sono considerate di solito le concentrazioni critiche per tali farmaci. Per concentrazione critica si intende la concentrazione di farmaco che inibisce la sotto-popolazione selvaggia, consentendo tuttavia una crescita sufficiente della sotto-popolazione resistente mutante per permettere di determinare la resistenza alla soglia critica dell'1%. La concentrazione elevata del farmaco non è considerata la concentrazione critica. Tuttavia la resistenza alla concentrazione elevata indica che la resistenza è in genere diffusa tra la popolazione del ceppo di *M. tuberculosis* testato. Alcuni clinici usano i risultati del test di sensibilità alle concentrazioni elevate per determinare il grado di resistenza del ceppo testato.

Il test **BACTEC MGIT 960 SIRE** consente di ottenere il risultato della sensibilità quasi nello stesso tempo del sistema **BACTEC 460TB**. Inoltre, questo metodo non è radiometrico e consente in genere di ottenere i risultati della sensibilità agli antibiotici specifici più rapidamente della procedura MOP.

Il sistema **BACTEC MGIT** è stato sviluppato per consentire la valutazione della sensibilità a streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo alla concentrazione critica e a una concentrazione più elevata per streptomina, isoniazide ed etambutolo. Queste concentrazioni si correlano con le due utilizzate nella procedura MOP. Il risultato di sensibilità ottenuto alla concentrazione critica può essere refertato e non vi è necessità di ulteriori test, sebbene un ceppo resistente alla concentrazione critica a streptomina, isoniazide ed etambutolo con il kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** possa essere almeno testato alla concentrazione elevata. In tal caso, il risultato finale di resistenza alla concentrazione critica può essere refertato, indicando che è in corso anche il test alla concentrazione elevata.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

La provetta **BBL MGIT 7 mL** per l'indicazione di crescita dei micobatteri è una provetta contenente Brodo Middlebrook 7H9 modificato che favorisce la crescita e la rilevazione dei micobatteri (vedere il foglietto illustrativo del prodotto **BBL MGIT 7 mL**). La provetta **MGIT** contiene un composto fluorescente immerso in un fondello di silicone di una provetta a fondo circolare da 16 x 100 mm. Il composto fluorescente è sensibile all'ossigeno dissolto nel brodo. La concentrazione iniziale di ossigeno dissolto nel terreno attenua l'emissione dal composto e consente la rilevazione di una modica quantità di fluorescenza. Successivamente i microrganismi attivi consumano l'ossigeno permettendo così una maggiore fluorescenza del composto.

Il kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** è un test qualitativo di 4 – 13 giorni. Il test è basato sulla crescita di colonie di *Mycobacterium tuberculosis* in due provette, una contenente farmaco e l'altra senza farmaco (Controllo crescita). Lo strumento **BACTEC MGIT** monitora la crescita di fluorescenza nelle provette. Lo strumento usa l'analisi della fluorescenza nella provetta con farmaco rispetto a quella della provetta del Controllo crescita per determinare i risultati di sensibilità.

Lo strumento **BACTEC MGIT** interpreta i risultati automaticamente usando algoritmi predefiniti (che mettono a confronto la crescita nella provetta con farmaco con quella nella provetta del Controllo crescita) e poi referta il risultato di sensibilità o di resistenza.

REAGENTI

Il kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** contiene una fiala liofilizzata di streptomina, una di isoniazide, una di rifampicina ed una di etambutolo e otto fiale di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Streptomina (STR)332 µg
Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Isoniazide (INH)33,2 µg
Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Rifampicina (RIF).....332 µg
Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Etambutolo (EMB)1660 µg

Il kit **BACTEC MGIT STR 4.0** contiene una fiala liofilizzata di streptomina e due fiale di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Streptomina.....664 µg

Il kit **BACTEC MGIT INH 0.4** contiene una fiala liofilizzata di isoniazide e due fiale di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Isoniazide66,4 µg

Il kit **BACTEC MGIT EMB 7.5** contiene una fiala liofilizzata di etambutolo e due fiale di supplemento SIRE.

Formula approssimata* per fiala di farmaco liofilizzato: Etambutolo1245 µg

Il supplemento **BACTEC MGIT SIRE 960** contiene 20 mL di arricchimento OADC Middlebrook.

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Albumina bovina50,0 g Catalasi0,03 g

Destrosio20,0 g Acido oleico0,6 g

*controllata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Conservazione e ricostituzione dei reagenti: Fiale dei farmaci **BACTEC MGIT 960 SIRE** – conservare le fiale dei farmaci liofilizzati, appena ricevute, a 2 – 8° C. Una volta ricostituite, le soluzioni di antibiotico possono essere conservate in congelatore ad una temperatura di almeno -20° C per un massimo di sei mesi, ma non oltre la data di scadenza originaria. Una volta scongelate, usarle immediatamente. Eliminare la parte non utilizzata.

Supplemento **BACTEC MGIT SIRE**– appena ricevuto, conservarlo al buio a 2 – 8° C. Non congelare o riscaldare. Aprire ed usare prima della data di scadenza. Esporre il meno possibile alla luce.

Istruzioni per l'uso:

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di streptomicina del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con 4 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 83 µg/mL.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di isoniazide del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con 4 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 8,3 µg/mL.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di rifampicina del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con 4 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 83 µg/mL.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di etambutolo del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con 4 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 415 µg/mL.

NOTA: Le seguenti fiale vengono ricostituite con un volume diverso. Il mancato impiego del volume appropriato di acqua distillata sterile per ricostituire le concentrazioni più elevate di farmaco invalida i risultati nei test.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di streptomicina del kit **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** con 2 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 332 µg/mL.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di isoniazide del kit **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** con 2 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 33,2 µg/mL.

Ricostituire ogni fiala liofilizzata di etambutolo del kit **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** con 2 mL di acqua distillata/deionizzata sterile per ottenere una soluzione stock di 622,5 µg/mL.

PRECAUZIONI:

Per uso diagnostico *in vitro*.

CAMPIONI D'ANALISI POTENZIALMENTE INFETTI: osservare le "Precauzioni universali"⁴ e le norme del laboratorio locale per la manipolazione e lo smaltimento di materiale infetto.

Quando si lavora con una coltura in crescita di *M. tuberculosis* è necessario attenersi alle procedure di sicurezza biologica (BSL) di livello 3 e disporre di adeguate attrezzature e contenitori.

Leggere e seguire le istruzioni contenute nei relativi foglietti illustrativi, compreso quello della Provetta **BBL MGIT 7 mL** per l'indicazione di crescita dei micobatteri.

Esaminare le provette e i flaconi prima dell'utilizzo, per accertarsi che non siano contaminati o danneggiati. Eliminare le provette e i flaconi non idonei o le provette **MGIT** che presentano fluorescenza prima dell'uso.

In caso di rottura di una provetta: 1) chiudere i cassetti dello strumento; 2) spegnere lo strumento; 3) sgombrare la zona immediatamente; 4) consultare i regolamenti del laboratorio. Una provetta inocolata rotta o con perdite può produrre un aerosol di micobatteri e pertanto deve essere trattata in modo opportuno.

Sterilizzare in autoclave tutte le provette **MGIT** inoculate prima di eliminarle.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Le modalità di preparazione qui illustrate si riferiscono a colture di *Mycobacterium tuberculosis*. Il laboratorio deve confermare, mediante tecniche di identificazione appropriate, che la colonia da testare è una coltura pura.

Preparazione della colonia da terreno solido:

1. Aggiungere 4 mL di Brodo **BBL Middlebrook 7H9** (o Brodo **BBL MGIT**) in una provetta sterile da 16,5 x 128 mm munita di tappo e contenente 8 – 10 microsfere di vetro.
2. Con un'ansa sterile, prelevare dalla parte in crescita quante più colonie possibile di non più di 14 giorni, cercando di non rimuovere terreno solido. Sospendere le colonie nel Brodo

Middlebrook 7H9. La torbidità della sospensione deve essere superiore allo standard McFarland 1.0.

3. Vortexare la sospensione per 2 – 3 min per frammentare i grumi più grossi.
4. Lasciar riposare la sospensione per 20 min senza toccarla.
5. Trasferire il sovrantante in un'altra provetta sterile da 16,5 x 128 mm con tappo (evitare di trasferire il sedimento) e lasciar riposare per altri 15 min.
6. Trasferire il sovrantante (dovrebbe essere omogeneo, privo di grumi) in una terza provetta sterile da 16,5 x 128 mm.
7. Regolare la torbidità della sospensione sullo standard McFarland 0,5 mediante un raffronto visivo con lo stesso standard.
8. Diluire 1 mL della sospensione così regolata in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5).

Preparazione a partire da una provetta positiva BACTEC MGIT:

1. Per la preparazione dell'inoculo da testare, usare una provetta positiva **MGIT** da 7 mL dal giorno **seguito** la comparsa di positività (Giorno 1) sullo strumento **BACTEC MGIT**, al quinto giorno compreso di positività (Giorno 5). Una provetta positiva da oltre cinque giorni deve essere sottoposta a subcoltura in una nuova provetta **MGIT** da 7 mL contenente il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** e testata sullo strumento **BACTEC MGIT** fino alla comparsa di positività e quindi usata tra il primo e il quinto giorno di positività.
2. Se la provetta è nel Giorno 1 o Giorno 2 di positività, passare a "Procedura di inoculo per il test di sensibilità".
3. Se la provetta è nel Giorno 3, Giorno 4 o Giorno 5 di positività, diluire 1 mL di brodo positivo in 4 mL di soluzione fisiologica sterile (diluizione 1:5). Usare la sospensione diluita per le procedure di inoculo. Passare a "Procedura di inoculo per il test di sensibilità".

PROCEDURA

Materiale fornito: Kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** contenente una fiala liofilizzata di ogni farmaco e otto fiale di supplemento SIRE (circa 40 test per farmaco per kit), Kit **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** contenente una fiala di farmaco liofilizzata e due fiale di supplemento SIRE (circa 20 test per kit), Kit **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** contenente una fiala di farmaco liofilizzata e due fiale di supplemento SIRE (circa 20 test per kit) e Kit **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** contenente una fiala di farmaco liofilizzata e due fiale di supplemento SIRE (circa 20 test per kit).

Materiale non fornito: Provette **BBL MGIT 7 mL** per l'indicazione di crescita dei micobatteri, terreni di coltura ausiliari, reagenti, organismi per il controllo di qualità e attrezzatura di laboratorio necessaria per questa procedura.

Procedura di inoculo per il test di sensibilità del kit BACTEC MGIT 960 SIRE:

1. Etichettare cinque provette **MGIT** da 7 mL per ogni colonia da testare. Contrassegnarne una come GC (= Growth Control o Controllo crescita), una come STR, una come INH, una come RIF e l'ultima come EMB. Collocare le provette nella sequenza corretta, nel carrello appropriato per quel set AST (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**).
2. Aggiungere in modo sterile 0,8 mL di supplemento **BACTEC MGIT SIRE** in ogni provetta. **NOTA:** è importante usare il supplemento corretto.
3. Con una micropipetta, trasferire in modo sterile 100 µL di soluzione **MGIT STR** da 83 µg/mL nella provetta **MGIT** appropriata. Con una micropipetta, trasferire in modo sterile 100 µL di soluzione **MGIT INH** da 8,3 µg/mL nella provetta **MGIT** appropriata. Con una micropipetta, trasferire in modo sterile 100 µL di soluzione **MGIT RIF** da 83 µg/mL nella provetta **MGIT** appropriata. Con una micropipetta, trasferire in modo sterile 100 µL di soluzione **MGIT EMB** da 415 µg/mL nella provetta **MGIT** appropriata. Non vanno aggiunti antibiotici nella provetta **MGIT GC**.

Farmaco	Concentrazione del farmaco dopo la ricostituzione**	Volume aggiunto nelle provette MGIT per il test	Concentrazione finale nelle provette MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1* µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0* µg/mL

*Equivalente alla concentrazione critica di farmaco raccomandata dal CDC.⁴

**Per ottenere le concentrazioni indicate, ricostituire i farmaci con 4 mL di acqua sterile/deionizzata.

4. **Preparazione ed inoculo della provetta del Controllo crescita:** Pipettare in modo sterile 0,1 mL di sospensione dell'organismo (vedi "Preparazione dei campioni") in 10 mL di soluzione fisiologica sterile per preparare la sospensione 1:100 del Controllo crescita. Mescolare accuratamente la sospensione del Controllo crescita. Inoculare 0,5 mL della sospensione 1:100 del Controllo crescita in una provetta **MGIT** con etichetta "GC".
5. **Inoculo delle provette contenenti farmaco:** Pipettare in modo sterile 0,5 mL di sospensione dell'organismo (vedi "Preparazione dei campioni") in ognuna delle altre QUATTRO provette con farmaco: STR, INH, RIF, EMB.

6. Riavvitare bene il tappo e miscelare accuratamente.
7. Introdurre il set AST nel kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** usando la funzione di entrata del set AST (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**). Accertarsi che l'ordine delle provette nel carrello per il set AST sia conforme alla definizione di carrello selezionata all'attivazione della funzione di entrata del set AST.
8. Seminare 0,1 mL di sospensione dell'organismo su una piastra di Agar soia **Trypticase** con 5% di sangue di montone (TSA II). Mettere in una busta di plastica e incubare a 35 – 37° C.
9. Controllare la piastra di agar sangue dopo 48 h per la contaminazione batterica. Se non si nota alcuna crescita sulla piastra, continuare il test AST. Se si nota qualche crescita sulla piastra, eliminare il set AST (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**) e ripetere il test con una coltura pura.

Procedura di inoculo per il test di sensibilità dei kit BACTEC MGIT STR 4.0, INH 0.4 e EMB 7.5:

In caso di resistenza alla concentrazione critica, eseguire un test facoltativo di profilo che testi almeno la concentrazione elevata del farmaco per cui si era verificata la resistenza.

Provenienza della colonia: La colonia usata per questo test deve essere preparata come descritto in "Preparazione dei campioni." Si può preparare una provetta di semina dalla provetta senza farmaco del Controllo crescita, proveniente dal set AST della colonia precedentemente testato, da cui si può inoculare 0,5 mL di questa in una nuova provetta **MGIT** da 7 mL contenente il supplemento di crescita **BACTEC MGIT**. Non appena la provetta di semina diventa positiva per lo strumento, procedere come descritto in "Preparazione dei campioni: Preparazione da una provetta positiva **MGIT**".

1. Etichettare un numero sufficiente di provette **MGIT** da 7 mL in modo che la colonia da testare abbia una provetta **MGIT GC** (Controllo crescita) e una provetta **MGIT** di farmaco per ogni farmaco da testare.
2. Aggiungere in modo sterile 0,8 mL di supplemento **BACTEC MGIT SIRE** in ogni provetta. **NOTA:** è importante usare il supplemento corretto.
3. Con una micropipetta, trasferire in modo sterile 100 µL di soluzione del farmaco nella provetta **MGIT** che porta la stessa etichetta. Non vanno aggiunti antibiotici nella provetta **MGIT GC**.

Farmaco	Concentrazione del farmaco dopo la ricostituzione**	Volume aggiunto nelle provette MGIT per il test	Concentrazione finale nelle provette MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0* µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2µg/mL	100 µL	0,4* µg/mL
MGIT EMB 7.5	622,5 µg/mL	100 µL	7,5* µg/mL

*Equivalente alle concentrazioni di farmaco elevate del metodo MOP⁴

**Per ottenere le concentrazioni indicate, ricostituire i farmaci con 2 mL di acqua sterile/deionizzata.

4. **Preparazione ed inoculo della provetta del Controllo crescita:** Pipettare in modo sterile 0,1 mL di sospensione dell'organismo (vedi "Preparazione dei campioni") in 10 mL di soluzione fisiologica sterile per preparare la sospensione 1:100 del Controllo crescita. Mescolare accuratamente la sospensione del Controllo crescita. Inoculare 0,5 mL della sospensione 1:100 del Controllo crescita in una provetta **MGIT** con etichetta "GC".
5. **Inoculo delle provette contenenti farmaco:** Pipettare in modo sterile 0,5 mL di sospensione dell'organismo (vedi "Preparazione dei campioni") in ognuna delle provette con farmaco.
6. Riavvitare bene il tappo e miscelare accuratamente.
7. Introdurre il set AST nello strumento **BACTEC MGIT** usando la funzione di entrata del set AST (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**). Accertarsi che l'ordine delle provette nel carrello per il set AST sia conforme alla definizione di carrello selezionata all'attivazione della funzione di entrata del set AST.
8. Seminare 0,1 mL di sospensione dell'organismo su una piastra di Agar soia **Trypticase** con 5% di sangue di montone (TSA II). Mettere in una busta di plastica e incubare a 35 – 37° C.
9. Controllare la piastra di agar sangue dopo 48 h per la contaminazione batterica. Se non si nota alcuna crescita sulla piastra, continuare il test AST. Se si nota qualche crescita sulla piastra, eliminare il set AST (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**) e ripetere il test con una coltura pura.

NOTA: Il test di sensibilità può essere configurato in diversi modi. Un tipo di configurazione, ad esempio, può essere il set di cinque provette contenente solo le concentrazioni critiche. Si possono configurare altri tipi di set in funzione dei test facoltativi di profilo che si vogliono eseguire (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**).

Controllo di qualità per l'utilizzatore: Per ogni nuova partita o nuovo numero di lotto di fiale del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE**, si consiglia di eseguire il test di controllo con l'organismo indicato di seguito (vedi "Procedura di inoculo per il test di sensibilità"). Se entro 4 – 13 giorni si ottengono risultati conformi a quelli della tabella seguente, il kit per test **BACTEC MGIT 960 SIRE** è pronto per essere usato per colonie di pazienti. Se non si ottengono i risultati appropriati, ripetere il test. Se, pur ripetendo il test, non si ottengono i risultati appropriati, non usare il prodotto finché non si sia contattato il rappresentante locale Becton Dickinson.

Lo stesso organismo di controllo deve essere testato come Controllo Qualità in batch una volta alla settimana quando si esegue il test di sensibilità. Se il Controllo Qualità in batch non riesce, non refertare i risultati per il farmaco (o i farmaci) il cui test non è riuscito per il periodo considerato. Ripetere il Controllo Qualità per il farmaco (o i farmaci) e per le colonie di pazienti il cui test di Controllo Qualità non è inizialmente riuscito. Se la ripetizione del Controllo qualità non fornisce i risultati attesi, non refertare i risultati per quel paziente. Non usare il prodotto finché non si sia contattato il rappresentante locale Becton Dickinson.

Ceppi	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positivo	Sensibile	Sensibile	Sensibile	Sensibile

Ceppi	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4	MGIT EMB 7.5
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positivo	Sensibile	Sensibile	Sensibile

REFERTO DEI RISULTATI

Lo strumento **BACTEC MGIT** monitora i set testati per la sensibilità fino al momento della determinazione di sensibilità o resistenza. Una volta completato il test, lo strumento **BACTEC MGIT** referta i risultati. (vedi Manuale di utilizzo dello strumento **BACTEC MGIT**).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Prima di standardizzare le sospensioni preparate da terreni solidi, lasciarle riposare per il tempo prescritto. Le sospensioni per inoculo preparate da terreni solidi senza standard di torbidità McFarland 0,5 e le diluizioni appropriate possono dare risultati inaccurati.

Usare solo colture pure di *M. tuberculosis*. Colture contaminate o contenenti ceppi multipli di micobatteri possono dare risultati errati.

La mancata ricostituzione dei farmaci con il volume corretto di acqua deionizzata sterile può determinare risultati inaccurati.

La mancata diluizione 1:100 della colonia per l'inoculo della provetta del Controllo crescita può determinare risultati inaccurati.

Il mancato caricamento delle provette del set AST nel carrello per set AST nell'ordine appropriato può determinare risultati inaccurati.

Il mancato impiego del supplemento SIRE nel set AST può determinare risultati inaccurati. Non aggiungere il supplemento di crescita **BACTEC MGIT** nel set AST.

VALORI ATTESI

Vedi addenda

CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

Vedi addenda

DISPONIBILITÀ

N° di cat.	Descrizione
245123	Kit BACTEC MGIT 960 SIRE , confezione da 4 fiale di farmaco liofilizzato e 8 supplementi SIRE.
245125	Kit BACTEC MGIT 960 STR 4.0 , confezione da 1 fiala di farmaco liofilizzato e 2 supplementi SIRE.
245126	Kit BACTEC MGIT 960 INH 0.4 , confezione da 1 fiala di farmaco liofilizzato e 2 supplementi SIRE.
245127	Kit BACTEC MGIT 960 EMB 7.5 , confezione da 1 fiala di farmaco liofilizzato e 2 supplementi SIRE.



Kit BACTEC MGIT 960 SIRE

Para la prueba de sensibilidad antimicobacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*

Español

USO PREVISTO

El kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** se utiliza como un procedimiento cualitativo rápido para la prueba de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a la estreptomicina, isoniacida, rifampicina y etambutol, a partir de un cultivo, utilizando los sistemas **BACTEC MGIT 960** y **BACTEC MGIT 320**.

RESUMEN Y EXPLICACION

La prueba de sensibilidad antimicobacteriana es necesaria para el tratamiento adecuado de pacientes con tuberculosis. Por lo general, el tratamiento para la tuberculosis consiste en un régimen de antibióticos múltiples que incluye los antibióticos antimicobacterianos estreptomina, isoniacida, rifampicina y/o etambutol. Es importante que los antibióticos antimicobacterianos prescritos presenten la actividad apropiada contra la *Mycobacterium tuberculosis*, es decir, sensibilidad del aislado al antibiótico.

La *Mycobacterium tuberculosis* resistente a varios antibióticos (MDR-TB) se ha convertido recientemente en un serio problema para la salud pública.¹ La resistencia a cualquiera de los cuatro antibióticos más importantes, la estreptomina (STR), la isoniacida (INH), la rifampicina (RIF) y el etambutol (EMB), hace más difícil y costoso el tratamiento de la enfermedad. Para el tratamiento efectivo del paciente, es crucial la detección rápida de estas cepas.

Dos métodos han sido utilizados ampliamente para las pruebas de sensibilidad antimicobacteriana. El primer método, conocido como el Método de las Proporciones,² utiliza el Agar Middlebrook y Cohn 7H10. Este método compara el número de colonias en medios con y sin antibiótico. La resistencia a un antibiótico se detecta cuando el 1% o más de una población bacteriana es resistente a la concentración del antibiótico analizado. Generalmente, los resultados pueden obtenerse después de 21 días de incubación. El segundo método, conocido como el método BACTEC 460TB de sensibilidad radiométrica,³ tarda generalmente de 4 a 12 días. Este método se basa en la producción de dióxido de carbono marcado radioactivamente con C¹⁴ por parte de las micobacterias que están creciendo, y se manifiesta por un aumento en el índice de crecimiento en el sistema.

Tradicionalmente, el procedimiento del Método de las Proporciones (MOP) ha incluido el análisis de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a dos concentraciones de los agentes antimicrobianos. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) sigue recomendando que el procedimiento del análisis MOP incluya dos concentraciones de los principales antibióticos analizados, con la excepción de la rifampicina. Las concentraciones bajas recomendadas para el procedimiento MOP suelen corresponder a las concentraciones que se consideran críticas para estos antibióticos. La concentración crítica se define como la concentración de antibiótico que inhibe la subpoblación de tipo salvaje mientras permite suficiente crecimiento de la subpoblación mutante resistente para permitir la determinación de la presencia de resistencia a la proporción crítica del 1%. La concentración alta del antibiótico no es la concentración considerada crítica. Sin embargo, la resistencia a esta concentración alta es evidencia de que la resistencia está distribuida generalmente por la población de la cepa de *M. tuberculosis* siendo analizada. Algunos clínicos utilizan los resultados de los análisis de sensibilidad a concentraciones altas para perfilar el grado de resistencia de la cepa analizada.

La prueba BACTEC MGIT 960 SIRE proporciona el resultado de la sensibilidad en aproximadamente el mismo margen de tiempo que el sistema BACTEC 460TB. Además, este método no es radiométrico y permite, en la mayoría de los casos, que los resultados de sensibilidad se notifiquen antes que con el procedimiento del Método de las Proporciones (MOP).

El sistema BACTEC MGIT ha sido desarrollado para permitir el análisis de la sensibilidad a las concentraciones críticas de estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol, y a las concentraciones más altas de estreptomina, isoniacida y etambutol. Estas concentraciones se correlacionan con las dos concentraciones utilizadas en el procedimiento MOP. Se puede informar la sensibilidad a la concentración crítica sin necesidad de realizar más análisis. Sin embargo, cualquier cepa que ha evidenciado resistencia con el kit BACTEC MGIT 960 SIRE a la estreptomina, isoniacida y etambutol a concentraciones críticas puede, al menos, analizarse a la concentración alta. En este caso, puede informarse un resultado final de resistencia a la concentración crítica, con un aviso de que se están haciendo análisis adicionales a la concentración alta.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El tubo indicador de crecimiento micobacteriano BBL MGIT de 7 mL es un tubo que contiene Caldo Middlebrook 7H9 modificado que permite el crecimiento y detección de micobacterias (vea el prospecto del BBL MGIT de 7 mL). El tubo MGIT contiene un compuesto fluorescente embebido en silicón que está en la parte inferior de un tubo de 16 x 100 mm de fondo redondo. El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial del oxígeno disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Más tarde, la respiración activa de los microorganismos consume el oxígeno, que permite la fluorescencia del compuesto.

El kit BACTEC MGIT 960 SIRE es un análisis cualitativo que dura 4 – 13 días. La prueba se basa en la comparación del crecimiento del aislado de *Mycobacterium tuberculosis* en un tubo con antibiótico con otro sin antibiótico (control de crecimiento). El instrumento BACTEC MGIT monitoriza los tubos para detectar un aumento de su fluorescencia. El análisis de la fluorescencia del tubo que contiene antibiótico comparada con la fluorescencia del tubo de control de crecimiento es utilizado por el instrumento para determinar los resultados de la sensibilidad.

El instrumento BACTEC MGIT interpreta estos resultados automáticamente utilizando algoritmos previamente definidos (que comparan el crecimiento en el tubo que contiene antibiótico y en el tubo de control de crecimiento) y el instrumento informa un resultado de sensibilidad o resistencia.

REACTIVOS

El kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** contiene frascos individuales de estreptomocina, isoniacida, rifampicina y etambutol liofilizados y ocho frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Estreptomocina (STR)332 µg

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Isoniacida (INH)33,2 µg

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Rifampicina (RIF)332 µg

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Etambutol (EMB).....1660 µg

El kit **BACTEC MGIT STR 4.0** contiene un frasco de estreptomocina liofilizada y dos frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Estreptomocina.....664 µg

El kit **BACTEC MGIT INH 0.4** contiene un frasco de isoniacida liofilizada y dos frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Isoniacida66,4 µg

El kit **BACTEC MGIT EMB 7.5** contiene un frasco de etambutol liofilizado y dos frascos de suplemento SIRE.

Fórmula aproximada* por frasco de antibiótico liofilizado: Etambutol1245 µg

El suplemento **BACTEC MGIT 960 SIRE** contiene 20 mL de enriquecimiento Middlebrook OADC

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Albúmina bovina50,0 g Catalasa0,03 g

Dextrosa20,0 g Ácido oleico.....0,6 g

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Almacenamiento y reconstitución de los reactivos: Frascos de antibiótico **BACTEC MGIT 960 SIRE** – tras su entrega, almacene los frascos de antibiótico liofilizado a 2 – 8° C. Después de haber sido reconstituídos, las soluciones de antibiótico pueden ser congeladas y almacenadas a -20° C o menos hasta seis meses, siempre que este período no sobrepase la fecha de caducidad original. Una vez descongeladas, utilícelas inmediatamente. Deseche cualquier porción no utilizada.

Suplemento **BACTEC MGIT SIRE** – tras su entrega, almacénelo en un lugar oscuro a 2 – 8° C. Evite la congelación y el sobrecalentamiento. Abra y utilícelo antes de la fecha de caducidad. Reduzca al mínimo la exposición a la luz.

Instrucciones de uso:

Reconstituya cada frasco de estreptomocina liofilizada del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 83 µg/mL.

Reconstituya cada frasco de isoniacida liofilizada del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 8,3 µg/mL.

Reconstituya cada frasco de rifampicina liofilizada del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 83 µg/mL.

Reconstituya cada frasco de etambutol liofilizado del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con **4 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 415 µg/mL.

NOTA: Los antibióticos siguientes se reconstituyen con un volumen diferente. Si no se utiliza el volumen apropiado de agua destilada estéril para la reconstitución de las concentraciones altas de antibiótico, invalidará los resultados de los análisis.

Reconstituya cada frasco de estreptomocina liofilizada del kit **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** con **2 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 332 µg/mL.

Reconstituya cada frasco de isoniacida liofilizada del kit **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** con **2 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 33,2 µg/mL.

Reconstituya cada frasco de etambutol liofilizado del kit **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** con **2 mL** de agua estéril destilada/desionizada para hacer una solución estándar de 622,5 µg/mL.

Advertencia:

Para diagnóstico *in vitro*.

MUESTRA DE ANÁLISIS POTENCIALMENTE INFECCIOSA: Siga las "Precauciones universales"⁴ y las normas institucionales para la manipulación y desecho de materiales infecciosos.

El trabajo con cultivos de *M. tuberculosis* requiere prácticas del Nivel de bioseguridad (BSL) 3 y equipo e instalaciones para la contención.

Lea y siga las instrucciones contenidas en todos los prospectos correspondientes, incluyendo el tubo indicador de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL.

Antes de usarlos, el usuario debe revisar los tubos y frascos en busca de indicios de contaminación o daño. Deseche cualquier tubo o frasco que no reúna las condiciones adecuadas o tubos **MGIT** que exhiban fluorescencia antes de utilizarlos.

En el caso de romperse un tubo: 1) cierre los cajones del instrumento; 2) apague el instrumento; 3) desaloje la zona inmediatamente; 4) consulte las normas de su institución/CDC. Un tubo inoculado que tiene pérdidas o está roto puede producir un aerosol de micobacterias; deben observarse las normas de manipulación adecuadas.

Todos los tubos **MGIT** inoculados deben ser esterilizados en autoclave antes de desecharse.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Todas las preparaciones detalladas más adelante corresponden a cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. Mediante las técnicas de identificación apropiadas, el laboratorio debe confirmar que el aislado a ser analizado es un cultivo puro.

Preparación del aislado a partir de medios sólidos:

1. Agregue 4 mL de Caldo **BBL Middlebrook 7H9** (o caldo **BBL MGIT**) a un tubo estéril de 16,5 x 128 mm, con tapón, que contiene 8 – 10 perlas de cristal.
2. Con un asa esterilizada, levante todas las colonias que pueda de un cultivo de menos de 14 días, procurando evitar coger medio sólido. Haga una suspensión de las colonias en el Caldo Middlebrook 7H9. La turbidez de la suspensión debe superar el estándar 1 McFarland.
3. Agite la suspensión en un agitador vórtex durante 2 – 3 min para dispersar los grumos más grandes.
4. Permita que la suspensión repose durante 20 min sin moverla.
5. Transfiera el líquido sobrenadante a otro tubo estéril de 16,5 x 128 mm con tapón (evite transferir cualquier porción del sedimento) y deje reposar durante 15 min más.
6. Transfiera el líquido sobrenadante (éste debe estar libre de grumos) a un tercer tubo estéril de 16,5 x 128 mm.
7. Ajuste la suspensión a 0,5 McFarland por comparación visual con el estándar de turbidez de 0,5 McFarland.
8. Diluya 1 mL de la suspensión ajustada en 4 mL de suero salino estéril (dilución de 1:5).

Preparación a partir de un tubo **BACTEC MGIT** positivo:

1. Para hacer una preparación del inóculo de análisis, se debe usar un tubo **MGIT** de 7 mL positivo y realizar el inóculo el día **después** de registrar positividad por el instrumento **BACTEC MGIT** (día 1), y hasta el quinto día inclusive (día 5) de registrar positividad por el instrumento. Si un tubo ha permanecido positivo más de cinco días, se debe hacer un subcultivo en un nuevo tubo **MGIT** de 7 mL que contiene suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**, analizarle en el instrumento **BACTEC MGIT** hasta que evidencie positividad y utilizarlo de uno a cinco días después de detectar la positividad.
2. Si el tubo positivo es del día 1 o del día 2, continúe con el "Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad".
3. Si el tubo positivo es del día 3, día 4 o día 5, diluya 1 mL del caldo positivo en 4 mL de solución salina estéril (dilución de 1:5). Utilice la suspensión diluida para los procedimientos de inoculación. Continúe con el "Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad".

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** con frascos individuales de cada antibiótico liofilizado y ocho frascos de suplemento **SIRE** (se obtienen aproximadamente 40 pruebas de cada antibiótico del kit). Kit **BACTEC MGIT 960 STR 4.0** con un frasco de antibiótico liofilizado y dos frascos de suplemento **SIRE** (aproximadamente 20 pruebas por kit), kit **BACTEC MGIT 960 INH 0.4** con un frasco de antibiótico liofilizado y dos frascos de suplemento **SIRE** (aproximadamente 20 pruebas por kit) y kit **BACTEC MGIT 960 EMB 7.5** con un frasco de antibiótico liofilizado y dos frascos de suplemento **SIRE** (aproximadamente 20 pruebas por kit).

Materiales no suministrados: Tubos indicadores de crecimiento micobacteriano **BBL MGIT** de 7 mL, medios de cultivo auxiliares, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad con el kit **BACTEC MGIT 960 SIRE**:

1. Etiquete cinco tubos **MGIT** de 7 mL para cada aislado analizado. Etiquete uno como **GC** (control de crecimiento), uno como **STR**, uno como **INH**, uno como **RIF** y el último como **EMB**. Coloque los tubos en la secuencia correcta en el transportador del tamaño apropiado para el set **AST** (vea el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).
2. Agregue aseptícamente 0,8 mL de suplemento **BACTEC MGIT SIRE** a cada tubo. **NOTA:** Es importante usar el suplemento correcto.
3. Con una micropipeta, transfiera aseptícamente 100 µL de la solución **MGIT STR** de 83 µg/mL al tubo **MGIT** marcado apropiadamente. Con una pipeta, transfiera aseptícamente 100 µL de la solución **MGIT INH** de 8,3 µg/mL al tubo **MGIT** marcado apropiadamente. Con una pipeta, transfiera aseptícamente 100 µL de la solución **MGIT RIF** de 83 µg/mL al tubo **MGIT** marcado apropiadamente. Con una pipeta, transfiera aseptícamente 100 µL de la solución **MGIT EMB** de 415 µg/mL al tubo **MGIT** marcado apropiadamente. No deben añadirse antibióticos al tubo **MGIT GC**.

Antibiótico	Concentración del antibiótico reconstituido**	Volumen añadido a los tubos MGIT para la prueba	Concentración final en los tubos MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1* µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0* µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0* µg/mL

*Equivalente a la concentración crítica de antibiótico recomendada por los CDC.⁴

**Estos antibióticos deben reconstituirse utilizando 4 mL de agua estéril/desionizada para lograr las concentraciones indicadas.

- Preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento:** Con una pipeta, transfiera aseptícamente 0,1 mL de la suspensión de organismos (vea "Preparación de las muestras") a 10 mL de solución salina estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezcle bien la suspensión de control de crecimiento. Inocule 0,5 mL de la suspensión 1:100 de control de crecimiento al tubo MGIT etiquetado "GC."
- Inoculación de los tubos que contienen antibióticos:** Con una pipeta, transfiera aseptícamente 0,5 mL de la suspensión de organismos (vea "Preparación de las muestras") a cada uno de los CUATRO tubos de antibiótico STR, INH, RIF, EMB.
- Vuelva a tapar los tubos firmemente y mezcle bien.
- Introduzca el set AST en el kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** utilizando la función de introducción del set AST (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). Asegúrese de que la disposición de los tubos en el transportador del set AST coincida con las definiciones seleccionadas para el transportador cuando se efectúe la función de introducción del set AST.
- Extienda 0,1 mL de la suspensión organismos en una placa de agar soja **Trypticase** con 5% de sangre de carnero (TSA II). Coloque la placa dentro de una bolsa de plástico. Incube a 35 – 37° C.
- Inspeccione la placa de agar sangre a las 48 h en busca de contaminación bacteriana. Si la placa de agar sangre no evidencia crecimiento, el análisis AST puede proceder. Si la placa de agar sangre evidencia crecimiento, deseche el set AST (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**) y repita el análisis con un cultivo puro.

Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad con los kits **BACTEC MGIT 960 STR 4.0, INH 0.4 y EMB 7.5**:

Si se produce resistencia a la concentración crítica, se puede realizar optativamente una prueba del perfil que, al menos, analiza la concentración alta del antibiótico que evidenciaba resistencia originalmente:

Fuente del aislado: El aislado utilizado para este análisis debe prepararse según las instrucciones en "Preparación de las muestras". Se puede preparar un tubo de siembra del aislado a partir del tubo de control de crecimiento del set AST que ha sido analizado mediante la obtención de 0,5 mL para inocular en un nuevo tubo **MGIT** de 7 mL que contiene el suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT**. Una vez que el tubo de siembra es registrado como positivo por el instrumento, proceda según las instrucciones en "Preparación de las muestras: Preparación a partir de un tubo **MGIT** positivo".

- Etiquete suficientes tubos **MGIT** de 7 mL para que el aislado analizado tenga un tubo **MGIT GC** (control de crecimiento) y un tubo **MGIT** de antibiótico para todos los organismos antimicrobianos analizados.
- Agregue aseptícamente 0,8 mL de suplemento **BACTEC MGIT SIRE** a cada tubo. NOTA: es importante usar el suplemento correcto.
- Con una micropipeta, transfiera aseptícamente 100 µL de la solución de antibiótico al tubo **MGIT** etiquetado apropiadamente. No deben añadirse antibióticos al tubo **MGIT GC**.

Antibiótico	Concentración del antibiótico reconstituido**	Volumen añadido a los tubos MGIT para la prueba	Concentración final en los tubos MGIT
MGIT STR 4.0	332 µg/mL	100 µL	4,0* µg/mL
MGIT INH 0.4	33,2µg/mL	100 µL	0,4* µg/mL
MGIT EMB 7.5	622,5 µg/mL	100 µL	7,5* µg/mL

*Equivalente a las concentraciones altas de antibiótico del MOP.⁴

**Estos antibióticos deben reconstituirse utilizando 2 mL de agua estéril/desionizada para lograr las concentraciones indicadas.

- Preparación e inoculación del tubo de control de crecimiento:** Con una pipeta, transfiera aseptícamente 0,1 mL de la suspensión de organismo (vea "Preparación de las muestras") a 10 mL de solución salina estéril para preparar la suspensión 1:100 de control de crecimiento. Mezcle bien la suspensión de control de crecimiento. Inocule 0,5 mL de la suspensión 1:100 de control de crecimiento en el tubo **MGIT** etiquetado "GC".
- Inoculación del tubo que contiene antibiótico:** Con una pipeta, transfiera aseptícamente 0,5 mL de la suspensión de organismos (vea "Preparación de las muestras") a cada uno de los tubos de antibiótico.
- Vuelva a tapar los tubos firmemente y mezcle bien.

- Introduzca el set AST en el instrumento **BACTEC MGIT** utilizando la función de introducción del set AST (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**). Asegúrese de que la disposición de los tubos en el transportador del set AST coincida con las definiciones seleccionadas para el transportador cuando se efectúa la función de introducción del set AST.
- Extienda 0,1 mL de la suspensión organismos en una placa de agar soja **Trypticase** con 5% de sangre de carnero (TSA II). Coloque la placa dentro de una bolsa de plástico. Incube a 35 – 37° C.
- Inspeccione la placa de agar sangre a las 48 h en busca de contaminación bacteriana. Si la placa de agar sangre no evidencia crecimiento, el análisis AST puede proceder. Si la placa de agar sangre evidencia crecimiento, deseche el set AST (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**) y repita el análisis con un cultivo puro.

NOTA: La prueba de sensibilidad puede configurarse en diversos formatos. Por ejemplo, se puede configurar el sistema para un transportador de cinco tubos que contiene únicamente las concentraciones críticas. Se puede configurar una variedad de otros transportadores de tubos dependiendo de las pruebas de perfil optativas que se están realizando (consulte el Manual del usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).

Control de calidad por parte del usuario: Después de la entrega de un nuevo envío o número de lote de frascos del kit **BACTEC MGIT 960 SIRE**, se recomienda analizar los organismos de control indicados a continuación (vea “Procedimiento de inoculación para la prueba de sensibilidad”). La constatación de los resultados apropiados, mostrados a continuación, en el plazo de 4 – 13 días indica que el kit **BACTEC MGIT 960 SIRE** está listo para usarse con aislados de pacientes. Si no se observan los resultados apropiados, repita la prueba. Si los resultados obtenidos al repetir la prueba siguen siendo inapropiados, no utilice el producto hasta que se haya puesto en contacto con el representante local de Becton Dickinson.

El mismo organismo de control debe ser analizado como un CC de lote una vez a la semana cuando se realizan las pruebas de sensibilidad. Si el lote de CC no supera el análisis, no deben comunicarse los resultados del paciente para el(los) antibiótico(s) que no ha(n) superado este período de análisis. Repita el CC para el(los) antibiótico(s) y aislados de paciente afectados por el fallo inicial del CC. Si el CC repetido no produce los resultados esperados, no informe los resultados del paciente. No utilice el producto hasta que haya contactado al representante local de Becton Dickinson.

Cepas	GC	MGIT STR	MGIT INH	MGIT RIF	MGIT EMB
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positiva	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible

Cepas	GC	MGIT STR 4.0	MGIT INH 0.4	MGIT EMB 7.5
<i>M. tuberculosis</i> ATCC 27294	Positiva	Sensible	Sensible	Sensible

INFORME DE RESULTADOS

El instrumento **BACTEC MGIT** monitorizará los conjuntos de pruebas de sensibilidad hasta obtenerse una determinación de resistencia o sensibilidad. Cuando se ha completado el análisis del conjunto, los resultados son informados por el instrumento **BACTEC MGIT** (consulte el Manual de usuario del instrumento **BACTEC MGIT**).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se debe permitir que las suspensiones preparadas a partir de medios sólidos reposen durante el tiempo prescrito antes de realizar la estandarización. Las preparaciones de inóculos hechas a partir de medios sólidos sin usar un estándar de turbidez de 0,5 McFarland y las diluciones apropiadas pueden producir resultados inexactos.

Utilice únicamente cultivos puros de *M. tuberculosis*. Los cultivos que están contaminados o que contienen varias cepas de micobacterias pueden producir resultados erróneos.

Si no se reconstituyen los antibióticos con los volúmenes apropiados de agua estéril desionizada, pueden obtenerse resultados inexactos.

Si no se utiliza una dilución de 1:100 del aislado para inocular el tubo de control de crecimiento, pueden obtenerse resultados inexactos.

Si no se colocan los tubos del set AST en el transportador del set AST en la secuencia correcta, pueden obtenerse resultados inexactos.

Si no se utiliza el suplemento SIRE en el set AST, pueden obtenerse resultados inexactos. No agregue suplemento para crecimiento **BACTEC MGIT** al set AST.

VALORES ESPERADOS

Vea el apéndice

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Vea el apéndice

DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
245123	Kit BACTEC MGIT 960 SIRE , caja de 4 frascos de antibiótico liofilizado y 8 suplementos SIRE.
245125	Kit BACTEC MGIT 960 STR 4.0 , caja de un frasco de antibiótico liofilizado y 2 suplementos SIRE.
245126	Kit BACTEC MGIT 960 INH 0.4 , caja de 1 frasco de antibiótico liofilizado y 2 suplementos SIRE.
245127	Kit BACTEC MGIT 960 EMB 7.5 , caja de 1 frasco de antibiótico liofilizado y 2 suplementos SIRE.



Do not reuse / Nepoužívejte opakovaně / Må ikke genbruges / Niet opnieuw gebruiken / Mitte kasutada korduvalt / Ei saa käyttää uudelleen / Usage unique / Nicht wiederverwenden / Μην το ξαναχρησιμοποιείτε / Egyszer használatos / Non riutilizzare / Tik vienkartiniam naudojimui / Må ikke gjenbrukes / Nie stosować powtórnie / Não reutilizar / Nepoužívajte opakovane / No reusar / Får ej återanvändas / Не използвайте отново / A nu se reutiliza / Tekrar kullananmayın / Ne upotrebļavajate ropovo / Не использовать повторно / Пайдаланбазыз / Ne koristite ropovo



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



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 kullanna tarihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /

RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /

ĀĀĀĀ-MM-DD / ĀĀĀĀ-MM (MM = slutning af måned) /

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 = mēnesio pabaiga) /

ĀĀĀĀ-MM-DD / ĀĀĀĀ-MM (MM = sluttet 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) /

ĀĀĀĀ-MM-DD / ĀĀĀĀ-MM (MM = slutet på månaden) /

ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = 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-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /

ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /

GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca) /



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 / Katalogové číslo / Número de catálogo / Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Katalog nөмірі



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 az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в EU / Rerezentant autorizat în Uniunea Europeană / Ανγυρα Τορλουγυ Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәклетті екіл / Autorizuirani predstavnik u EU



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 / Medicinska pomůcka 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 Diyagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Жасанды жағдайда жүргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska 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 / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (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 / Contêmo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържањието е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточнo 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

 Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BACTEC, BBL, MGIT and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD.