

**Revisions**


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

**Notes:**

- BD Cat. Number 231577
- Blank (Sheet) Size : Length: N/A      Width: N/A  
 Number of Pages: 22      Number of Sheets: 1  
 Page Size: Length 10 7/8"      Width 4.5"      Final Folded Size: N/A
- Style (see illustrations below): # 4



- VS Controlled By BD Caribe, LTD.
- 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:	Category and Description Package Insert, BBL Sensi-Disc Antimicrobial Discs		Sheet: 1 of 23 Scale: N/A	<b>A</b>
8840231				

# **BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Discs** For Use in Culture Media

Antimicrobial Agent	Code	Conc.
Streptomycin	*S-50	50 µg
Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine)	INH-1	1 µg
	INH-5	5 µg
P-Aminosalicylic Acid	PAS-10	10 µg
	PAS-50	50 µg
Ethambutol**	EM-25	25 µg
	EM-50	50 µg
Ethionamide***	EA-25	25 µg
Rifampin	*RA-25	25 µg

English: pages	1 – 4	Italiano: pagine	13 – 16	8840231
Français: pages	5 – 8	Español: páginas	16 – 20	2010/06
Deutsch: Seiten	9 – 12			

Pokyny vám poskytnú miestni zástupca spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / 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 instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / **Свяжитесь с местним представител на BD за инструкции.** / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / **Өзіндің жергілікті БД өкіліне жүгініп нұсқа алыңыз.** / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

## INTENDED USE

These discs are used in qualitative susceptibility testing procedures in culture media. They serve as a convenient method for addition of antimicrobial agents to culture media, especially for qualitative studies of mycobacteria and related organisms.

Certain susceptibility test discs, i.e., streptomycin, 10 µg, kanamycin, 30 µg and rifampin, 5 µg, are also recommended for use in this procedure.<sup>1,2</sup>

The discs are added to measured amounts of liquified agar medium, e.g., Middlebrook and Cohn 7H10 Agar or Seven H11 Agar, to prepare recommended concentrations of the antimicrobial agent in solidified agar.<sup>2</sup>

Falcon™ four compartment X Plate™ Petri dishes may be used with these discs. Three sections may be employed for various agents or differing concentrations of the same agent and the fourth section as a drug-free control.

\* Not for use in conventional (Bauer-Kirby or standardized) disc susceptibility tests.

\*\* Myambutol™: Wyeth Laboratories

\*\*\* Trecator™: Wyeth Laboratories

## SUMMARY AND EXPLANATION

Since 1882 when Koch showed that the tubercle bacillus was the cause of tuberculosis, a variety of media and methods have been investigated in an effort to reduce the time required for isolation and drug susceptibility testing.

Acid-fast bacilli from human specimens demonstrated by microscopic examination or culture are usually *Mycobacterium tuberculosis*; however, other pathogenic and possibly nonpathogenic acid-fast organisms may be found. These "atypical" or "unclassified" mycobacteria must be recognized and characterized in the laboratory because the prognosis and response to drug therapy differ greatly for disease caused by these organisms.

This disc susceptibility method employing discs in culture media has been shown to be a valuable and reliable tool for many laboratories.<sup>3-5</sup> The simplicity of preparation of disc medium, the convenience and economy of preparing any number of test plates, the stability of drugs in dry discs, the elimination of possible errors in diluting and measuring drug solutions and the immediate recognition of the drug and concentration present in each medium by means of coded discs make this a desirable technique. Only one medium is prepared; the different drugs and their concentrations are provided by the discs.

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

These discs are employed to impregnate the entire agar bed with a specific concentration of antimicrobial-agent. This is accomplished by first affixing the disc to the center of the plate quadrant and then adding a measured amount of agar. The plate is placed in the refrigerator and held overnight to permit diffusion throughout the medium. The plate is then inoculated with the test organism. Growth or no growth will occur, depending on whether the organism is resistant or susceptible to the agent and concentration employed in the quadrant. Since zones are not formed, the numbers of colonies or lack of growth on each quadrant is used to indicate drug susceptibility.

## REAGENTS

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

## Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

Observe aseptic techniques and established precautions against microbiological hazards throughout all procedures.<sup>1,6</sup> Perform all manipulations in a biological safety cabinet. Sterilize cultures, containers and other contaminated materials after use.

Biosafety Level 2 practices and procedures, containment equipment and facilities are required for non-aerosol-producing manipulations of clinical specimens such as preparation of acid-fast smears. All aerosol-generating activities must be conducted in a Class I or II biological safety cabinet. Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities are required for

laboratory activities in the propagation and manipulation of cultures of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Animal studies also require special procedures.<sup>6</sup>

#### Storage Instructions:

1. On receipt, store containers of discs at -20 to +8°C. If the laboratory refrigerator is frequently opened and closed, and a suitable temperature is not maintained, place there a supply sufficient only for use within a week.
2. Allow containers to come to room temperature before opening. Return unused discs to the refrigerator when application of discs has been completed.
3. Use the oldest discs first.

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

#### SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING<sup>1,2</sup>

Samples and digested, concentrated specimens, e.g., sputum, gastric lavage, urine, pleural, spinal, joint and other fluids, exudates and tissues, in which acid-fast bacilli are seen in smears, may be used in the direct susceptibility test method. Cultures derived from samples and specimens may be tested by the indirect method.

#### PROCEDURE

**Materials Provided:** In this package are **Sensi-Disc** Antimicrobial discs for Use in Culture Media as labeled.

#### Materials Required But Not Provided:

1. Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Base, or Seven H11 Agar Base and Middlebrook OADC Enrichment.
2. Water bath, approximately 45°C.
3. 100 x 15 mm style four compartment plates.
4. Single Place Dispensers or forceps.
5. Bunsen burner, connected to gas outlet.
6. Inoculating loop made from 24 to 26 gauge platinum or nichrome wire fitted into a standard bacteriological wire loop holder. The wire is formed into a "closed" loop two or three mm in diameter with a shaft about 2 1/2 inches long.
7. Incubator, 35°C or other appropriate temperature.
8. **Cornwall™** pipette, sterile 10 mL, or other type of pipette for delivering approximately 5 mL of medium.
9. Acid-fast stain reagents and equipment.
10. Microscopes, low power (or dissecting) and oil immersion.
11. Sterile purified water or 0.85% saline, 4.5 mL volumes in screw-capped tubes.
12. Pipettes, 1 mL and Pasteur capillary.
13. 16 x 125 mm screw-cap tubes.
14. Glass or plastic beads, 1 to 2 mm in diameter or high heat polystyrene plastic beads, such as **\*Styrone™** 700, 27 clear, No.7
15. Middlebrook 7H9 Broth.
16. Test tube mixer.
17. MacFarland No. 1 standard (prepared by adding 0.1 mL of 1% BaCl<sub>2</sub> to 9.9 mL of 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
18. For incubation in a CO<sub>2</sub>-enriched aerobic atmosphere, a **GasPak™** System operated with a **GasPak** Disposable Carbon Dioxide Generator Envelope, **GasPak** vented System, carbon dioxide incubator or other suitable system.

\* Trademark of the Dow Chemical Co.

#### Test Procedure:

##### A. Preparation of Plates

1. Prepare the required amount of complete sterile medium. It should be fluid and at approximately 50°C.
2. With Single Place Dispensers or sterile forceps, place discs centrally into three of the plate quadrants; the fourth quadrant serves as the drug-free control.
3. Affix the discs to the centers of the quadrants by adding a drop or two of the medium to each. If the medium is added via a needle, as with a **Cornwall** pipette, the discs may be rimmed with medium to hold them in place. The small amount of agar should gel at once.
4. Add the remainder of 5 mL of the medium to each quadrant. The resulting concentration of antimicrobial agent per mL of medium will then be one-fifth that of the disc content.
5. Place the plates in the refrigerator and hold overnight to permit diffusion throughout.
6. Inoculate the plates as described below.

##### B. Direct Drug Susceptibility Test<sup>1</sup>

The direct drug susceptibility test is performed on a specimen in which acid-fast bacilli (AFB) can be demonstrated on a smear of the digested, concentrated specimen.

1. Stain and read smears of concentrated clinical specimens, recording the average number of AFB found per oil immersion field (observe approximately 20 positive fields).
2. Select dilutions of the specimen digest on the basis of positive smear results as follows:

Microscopy	Inoculate
Less than 1 AFB/field	Undilute and 10 <sup>-2</sup> (1:100)
1 - 10 AFB/field	10 <sup>-1</sup> and 10 <sup>-3</sup> (1:10 and 1:1000)
More than 10 AFB/field	10 <sup>-2</sup> and 10 <sup>-4</sup> (1:100 and 1:10,000)

3. Make the indicated dilutions with 0.5 mL of the specimen digest and 4.5 mL of sterile water or saline. Mix and transfer successively 0.5 mL to 4.5 mL for the required dilutions.
4. With a capillary pipette, inoculate 3 drops onto each quadrant of the drug and control media. Two dilutions of inocula, usually one-hundredfold apart, are planted onto duplicate plates of medium.

##### C. Indirect Test<sup>1</sup>

Whenever possible, perform the Direct Test. The Indirect Test employs as the inoculum mycobacterial growth from a primary culture on a drug free liquid or solid medium and is indicated when:

1. The smear was negative and the primary culture has grown.

- The growth on the control of the direct test is inadequate for a reliable report.
- A reference culture is sent in by another laboratory.

For the test to be valid, the inoculum must be large enough (50 – 100 colonies on the control quadrant) for good growth, but not large enough to stimulate drug resistance due to the growth of spontaneously occurring drug resistant mutants.

- Remove approximately 2 to 5 mg of growth from the drug-free medium. Pick a small portion of each colony if possible.
- Transfer to a sterile 16 x 125 mm screw cap tube containing 6 to 8 glass or plastic beads and 3 mL of Polysorbate 80-albumin liquid medium (Middlebrook 7H9 Broth).
- Homogenize the cells in a test tube mixer for 5 to 10 min.
- Allow the large particles to settle, withdraw the supernate and adjust the density to approximately MacFarland No. 1 standard with sterile water or 0.85% sterile saline.
- Dilute to  $10^{-2}$  and  $10^{-4}$  by making serial tenfold dilutions in sterile distilled water or 0.85% saline.
- Proceed as for "Direct Test" for inoculation.

#### D. Incubation

Following inoculation, keep plates shielded from light and place plates, medium side down, in a GasPak CO<sub>2</sub> jar or other suitable system providing an aerobic atmosphere enriched with approximately 3 to 10% CO<sub>2</sub> and incubate at 35 to 37°C.

Where moisture loss may occur during incubation, place plates in CO<sub>2</sub> permeable plastic (polyethylene) bags. After squeezing air out of bags, seal bags with tape, a heat sealing apparatus, or fold over two or three times and staple.

Stack plates in bags not more than 6 plates in a pile; to prevent the accumulation of drops of moisture in the plates during incubation, place plastic plates on an insulating surface, e.g., styrofoam or several thicknesses of cardboard, etc., and not directly on a metal shelf, tray or basket.

Incubate bags of plates in an aerobic atmosphere enriched with approximately 3 to 10% CO<sub>2</sub> at 35 to 37°C.

Drug susceptibility tests can be examined after 5 to 7 days with a low-power dissecting microscope and a preliminary of positive culture findings given at the time of initial observation.<sup>7</sup> Final reporting should not be made until after 3 weeks of incubation because growth of resistant mutants may be slower on drug containing media than on the control.<sup>1,2</sup>

NOTE: Cultures from skin lesions suspected to be *M. marinum*, *M. ulcerans* or *M. haemophilum* must be incubated at a temperature not exceeding 33°C for primary isolation; cultures suspected to contain *M. avium* or *M. xenopi* exhibit optimum growth at 40 to 42°C.<sup>1</sup> Incubate a duplicate culture at 35 to 37°C.

**User Quality Control:** Check drug-free medium for performance by inoculation with pure cultures of stable control strains of mycobacteria producing known, desired reactions. A drug-susceptible strain of *M. tuberculosis* is satisfactory as a control to demonstrate the activity of drugs in the media used.<sup>2</sup>

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

#### RESULTS<sup>1</sup> – Direct and Indirect Tests

A test is considered valid when there are 50 or more colonies on at least one of the controls.

- Record bacterial growth on the control and drug medium quadrants as indicated below:

Confluent (500 or more colonies)	4+
Almost Confluent (200 - 500 colonies)	3+
100 - 200 colonies	2+
50 - 100 colonies	1+
Less than 50 colonies	Actual colony count

- Determine the percent of resistant bacilli by the following formula:

$$\frac{\text{Number of colonies on the drug quadrant}}{\text{Number of colonies on the control quadrant}} \times 100 = \% \text{ Resistance}$$

Sample Calculation

	Growth		% Resistant
	Undilute	$10^{-2}$	
Control	4+	100	
INH 0.2 µg/ mL	1+	10	10%
SM 2.0 µg/ mL	0	0	0%
PAS 2.0 µg/mL	0	0	0%

$$\frac{10 \text{ colonies}}{100 \text{ colonies}} \times 100\% = 10\% \text{ resistance}$$

NOTE: The colony size of organisms growing on drug containing media may be markedly smaller than on the control, especially with PAS; therefore, readings are based on numbers of colonies seen and not their size.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Since the observed drug susceptibility is a comparison of the amount of growth on control and drug-containing media, the inoculum for each culture must be of demonstrated uniformity. Uniform suspension of the inoculum and avoidance of large clumps are essential.
- Since modification of the proportion of resistant bacteria may occur with *in vitro* subculture, direct susceptibility testing using the processed specimen as inoculum is preferred whenever smear examination reveals acid-fast bacilli.
- If indirect susceptibility tests are made from cultures having discrete colonies, the inoculum must be prepared from a fully representative selection; all colony types seen should be sampled.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

##### Ethambutol Discs

Prior to release, all lots of Ethambutol discs (EM-25 or EM-50) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of Ethambutol. Ethambutol discs (EM-25 or EM-50) are placed in centrifuge tubes along with 5 mL of processed water, 2 mL of bromthymol blue and 10 mL of benzene. The tubes are centrifuged for 5 min. The benzene layer is then transferred to a 1 cm cell and the absorbance is read on an ultraviolet spectrophotometer. The absorbency of the test sample is compared to

a control solution consisting of 5 mL of processed water, 2 mL of bromthymol blue and 10 mL of benzene. The potency of the disc is then calculated.

#### Isoniazid Discs

Prior to release, all lots of Isoniazid discs (INH-1 or INH-5) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of Isoniazid. INH discs are placed in a volumetric flask and extracted at room temperature with 10 mL of 0.01 N hydrochloric acid. After 18 to 24 h, the extracts are filtered. The absorbency of each filtered extract is determined by ultraviolet spectrophotometry. The reference solution used is 0.01 N HCl. The amount of Isoniazid present in the discs is calculated based on the absorbance of a reference standard solution (within 10%) of the desired concentration.

#### Ethionamide Discs

Prior to release, all lots of Ethionamide discs (EA-25) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of Ethionamide. EA discs are placed in a volumetric flask and extracted at room temperature with 10 mL of methanol for 18 to 24 h. The absorbency of each extract solvent is determined by ultraviolet spectrophotometry. The reference solution used is methanol. The amount of Ethionamide present in the discs is calculated based on the absorbance of a reference standard solution (within 10%) of the desired concentration.

#### Streptomycin Discs

Prior to release, all lots of Streptomycin discs (S-50) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of Streptomycin by an assay procedure developed by BD Diagnostics based on the protocol for similar antimicrobial agents in the *Code of Federal Regulations*, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A – Susceptibility Discs.

#### Rifampin Discs

Prior to release, all lots of Rifampin discs (RA-25) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of Rifampin by an assay procedure developed by BD Diagnostics based on the protocol for similar antimicrobial agents in the *Code of Federal Regulations*, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A – Susceptibility Discs.

#### P-Aminosalicylic Acid Discs

Prior to release, all lots of P-Aminosalicylic Acid discs (PAS-10 or PAS-50) are tested for specific product characteristics. Representative samples of the lot are analyzed for the concentration of P-Aminosalicylic Acid. PAS discs are placed in a volumetric flask and extracted at room temperature with 10 mL of 0.1 N hydrochloric acid (HCl). After 18 to 24 h, the absorbance of each extract is determined by ultraviolet spectrophotometry. The reference solution used is 0.1 N HCl. The amount of P-Aminosalicylic Acid present in the discs is calculated based on the absorbance of a reference standard solution (within 10%) of the desired concentration.

#### AVAILABILITY

Cat. No.	Description
231570	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Streptomycin, 50 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231571	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine), 1 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231572	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine), 5 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231573	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> P-Aminosalicylic Acid, 10 µg, Single Cartridge of 50 discs
231574	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> P-Aminosalicylic Acid, 50 µg, Single Cartridge of 50 discs
231575	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Ethambutol, 25 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231576	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Ethambutol, 50 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231577	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Ethionamide, 25 µg, Single Cartridge of 50 discs C€
231578	<b>BBL™ Sensi-Disc™</b> Rifampin, 25 µg, Single Cartridge of 50 discs C€

#### REFERENCES

1. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta.
2. Hawkins, J.E., R.J. Wallace, Jr., and B.A. Brown. 1991. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Wayne, L.G., and I. Krasnow. Am. J. Clin. Pathol. 45:769.
4. Griffith, M., M.L. Barrett, H.L. Bodily, and R.M. Wood. 1967. Am. J. Clin. Pathol. 47:812.
5. Griffith, M.E., M.L. Matajack, M.L. Bissett, and R.M. Wood. 1971. Am. Rev. Respir. Dis. 103:423.
6. U.S. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, 4th ed. HHS Publication (CDC) 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
7. Runyon, E.H. 1973. Am. J. Clin. Pathol. 59:817.



# BD Disques Antibiotiques

## Sensi-Disc BBL

### destinés aux milieux de culture

Français

Antibiotique	Code	Conc.
Streptomycine	*S-50	50 µg
Isoniazide (Isonicotinoyl hydrazine)	INH-1	1 µg
	INH-5	5 µg
Acide <i>p</i> -aminosalicyclique	PAS-10	10 µg
	PAS-50	50 µg
Ethambutol**	EM-25	25 µg
	EM-50	50 µg
Ethionamide***	EA-25	25 µg
Rifampin	*RA-25	25 µg

#### APPLICATION

Ces disques sont utilisés dans le cadre de tests de sensibilité qualitatifs dans des milieux de culture. Ils représentent un moyen commode d'ajouter des agents antimicrobiens à un milieu de culture, en particulier dans les études qualitatives de mycobactéries et de microorganismes associés.

Certains disques de test de sensibilité (streptomycine, 10 µg, kanamycine, 30 µg et rifampine, 5 µg) sont également recommandés pour cette procédure.<sup>1,2</sup>

Les disques sont ajoutés à des quantités mesurées de milieu gélosé liquéfié, comme Middlebrook et Cohn 7H10 Agar ou Seven H11 Agar, afin de préparer les concentrations recommandées d'agent antimicrobien dans une gélose solidifiée.<sup>2</sup>

Des boîtes de Pétri **Falcon X Plate** à quatre compartiments peuvent être utilisées avec ces disques. Trois compartiments peuvent être destinés aux divers agents ou aux diverses concentrations d'un même agent et le quatrième comme milieu de contrôle (ne contenant pas d'agent).

\* Ne pas utiliser avec les disques pour tests de sensibilité conventionnels (Bauer-Kirby ou standardisé).

\*\* Myambutol : Wyeth Laboratories

\*\*\* Trecator : Wyeth Laboratories

#### RESUME ET EXPLICATION

Depuis que Koch a démontré, en 1882, que la bacille de la tuberculose est à l'origine de la tuberculose, de nombreux milieux et méthodes ont été testés afin de réduire la durée nécessaire à l'isolement et au test de sensibilité.

Les bacilles acido-résistants provenant d'échantillons humains mis en évidence par examen microscopique ou par culture sont en général des *Mycobacterium tuberculosis* ; cependant, d'autres microorganismes pathogènes ou parfois même non pathogènes peuvent également être présents. Ces mycobactéries " atypiques " ou " non classifiées " doivent être reconnues et caractérisées en laboratoire car le pronostic et la réponse à l'antibiothérapie varient de façon significative selon les maladies provoquées par ces microorganismes.

Cette méthode de test de sensibilité utilisant des disques dans les milieux de culture a été démontrée comme étant un outil efficace et fiable pour de nombreux laboratoires.<sup>3-5</sup> La simplicité de préparation du milieu sur disque, la commodité et la rentabilité des boîtes de test préparées, la stabilité des composants sur les disques secs, l'élimination des erreurs possibles lors de la dilution et de la mesure des solutions et, enfin, l'identification immédiate de l'antibiotique et de la concentration présents dans chacun des milieux à l'aide de disques codés en font une technique appréciable. Un seul milieu est préparé ; les différents antibiotiques et leurs concentrations sont fournies par les disques.

#### PRINCIPES DE LA METHODE

Ces disques sont utilisés pour imprégner l'ensemble de la couche de gélose avec une concentration spécifique d'agent antimicrobien. Le disque est d'abord fixé sur le centre du quadrant de la boîte, puis une quantité mesurée de gélose est ajoutée. La boîte est placée au réfrigérateur et conservée toute une nuit pour permettre la diffusion à l'ensemble du milieu. La boîte est ensuiteensemencée avec le microorganisme à tester. La croissance dépend de la résistance ou de la sensibilité du microorganisme à l'agent et de la concentration du quadrant. Etant donné qu'il n'y a aucune formation de zone, la sensibilité à l'agent est indiquée par le nombre de colonies ou l'absence de croissance dans chacun des quadrants.

#### REACTIFS

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

#### Avertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Respecter les techniques aseptiques et les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques tout au long des procédures.<sup>1,6</sup> Effectuer toutes les manipulations dans une hotte biologique de sécurité. Après usage, stériliser les cultures, les récipients et tout le matériel contaminé.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières.<sup>6</sup>

#### Instructions pour la conservation :

1. Dès réception, conserver les cartouches de disques à une température comprise entre -20 et +8 °C. Si le réfrigérateur du laboratoire est fréquemment ouvert et que la

température préconisée n'est pas assurée, n'y placer que la quantité de cartouches suffisante pour une semaine.

2. Laisser les cartouches se réchauffer jusqu'à atteindre la température ambiante avant de les ouvrir. Remettre les disques inutilisés au réfrigérateur une fois la pose des disques terminée.
3. Utiliser les disques les moins récents en premier.

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

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS<sup>1,2</sup>

Les échantillons digérés et concentrés (p. ex. expectoration, lavage gastrique, urine, liquides céphalorachidiens, pleuraux, articulaires et autres, exsudat et tissus), dans lesquels les bacilles acido-résistants sont détectés dans les frottis, peuvent être utilisés pour la méthode de test de sensibilité directe. Les cultures préparées à partir d'échantillons peuvent être testées par la méthode indirecte.

#### METHODE

**Matériaux fournis :** Ce carton contient des disques **Sensi-Disc** antimicrobiens à utiliser dans des milieux de culture, comme indiqué sur l'étiquette.

#### Matériaux requis mais non fournis :

1. Base de gélose Middlebrook et Cohn 7H10 ou Seven H11, et supplément d'enrichissement Middlebrook OADC.
2. Bain-marie à environ 45 °C.
3. Boîtes de Pétri 100 x 15 mm à quatre compartiments.
4. Distributeur à disque unique ou pinces.
5. Bec Bunsen, alimenté en gaz.
6. Ensemencement à anse de fil de platine ou de nichrome de calibre 24 à 26 placé sur un portoir à anse bactériologique standard. Le fil forme une boucle " fermée " d'un diamètre de 2 à 3 mm avec un axe d'environ 63 mm de longueur.
7. Incubateur à 35 °C ou à la température appropriée.
8. Pipette **Cornwall** de 10 mL stérile ou toute autre pipette capable de distribuer environ 5 mL de milieu.
9. Réactifs et matériel de coloration acido-résistante.
10. Microscopes de faible grossissement (ou à dissection) et à objectif à immersion.
11. Eau purifiée stérile ou sérum physiologique à 0,85 % , volumes de 4,5 mL en tubes à bouchons à vis.
12. Pipette 1 mL et micropipette capillaire Pasteur.
13. Tubes à bouchons à vis 16 x 125 mm.
14. Billes de verre ou de plastique de 1 à 2 mm de diamètre ou billes de polystyrène résistantes aux hautes températures telles que \*Styrone 700, 27 transparent, n° 7.
15. Bouillon Middlebrook 7H9.
16. Mixeur de tube à essai.
17. Standard MacFarland 1 (préparé en ajoutant 0,1 mL de BaCl<sub>2</sub> 1 % à 9,9 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 %).
18. Pour l'incubation dans une atmosphère aérobie enrichie en CO<sub>2</sub> : système **GasPak** fonctionnant avec une enveloppe **GasPak** jetable génératrice de dioxyde de carbone, un système ventilé **GasPak**, un incubateur au dioxyde de carbone ou tout autre système approprié.

\* Marque de commerce de Dow Chemical Co.

#### Mode opératoire du test :

##### A. Préparation des boîtes :

1. Préparer la quantité requise du milieu stérile complet. Elle doit être liquide et à une température de 50 °C environ.
2. A l'aide d'un distributeur de disque unique ou de pinces, mettre les disques en position centrale dans trois des quadrants de la boîte, le quatrième quadrant servant de contrôle (sans agent).
3. Fixer les disques dans les centres des quadrants en ajoutant à chacun une ou deux gouttes de milieu. Si le milieu est ajouté à l'aide d'une aiguille, ou avec une pipette **Cornwall**, les disques peuvent être entourés de milieu pour les maintenir en place. La petite quantité de gélose doit gélifier immédiatement.
4. Ajouter les 5 mL restants du milieu dans chaque quadrant. La concentration finale d'agent antimicrobien par mL de milieu est alors un cinquième de celle du contenu du disque.
5. Placer les boîtes dans le réfrigérateur et conserver pendant toute une nuit pour permettre la diffusion dans l'ensemble du milieu.
6. Ensemencer les boîtes comme décrit ci-dessous.

##### B. Test de sensibilité directe<sup>1</sup>

Le test de sensibilité directe est effectué sur un échantillon dans lequel les bacilles acido-résistants (BAR) sont mis en évidence sur un frottis de l'échantillon digéré et concentré.

1. Colorer et lire les frottis des échantillons cliniques concentrés en enregistrant le nombre moyen de BAR par champ d'immersion (observer environ 20 champs positifs).
2. Sélectionner des dilutions de l'échantillon digéré en tenant compte des résultats de frottis positifs, comme décrit ci-dessous :

Microscopie	Ensemencement
Moins de 1 BAR/champ	Non dilué et 10 <sup>-2</sup> (1/100)
1 - 10 BAR/champ	10 <sup>-1</sup> et 10 <sup>-3</sup> (1/10 et 1/1000)
Plus de 10 BAR/champ	10 <sup>-2</sup> et 10 <sup>-4</sup> (1/100 et 1/10 000)

3. Préparer les dilutions indiquées avec 0,5 mL d'échantillon digéré et 4,5 mL d'eau stérile ou de sérum physiologique. Mélanger et transférer successivement 0,5 mL à 4,5 mL pour les dilutions requises.
4. A l'aide d'une micropipette capillaire, ensemencer 3 gouttes dans chaque quadrant de milieu avec agent et de contrôle. Deux dilutions d'inoculum, généralement d'un rapport de 1 à 100, sont placées dans des boîtes de milieu dupliquées.

### C. Test indirect<sup>1</sup>

Si possible, toujours effectuer le test direct. Le test indirect utilise comme inoculum la croissance mycobactérienne d'une culture primaire dans un liquide sans agent ou dans un milieu solide ; il est conseillé lorsque :

1. le frottis est négatif et la croissance de la culture primaire a eu lieu.
2. la croissance sur le quadrant de contrôle du test direct est inadéquate pour générer un rapport fiable.
3. une culture de référence est envoyée par un autre laboratoire.

Pour que le test soit valide, l'inoculum doit être suffisamment grand (50 à 100 colonies dans le quadrant de contrôle) pour générer une bonne croissance, mais pas assez pour stimuler la résistance à l'agent provoquée par la croissance de mutants résistants apparaissant de façon spontanée.

1. Prélever environ 2 à 5 mg de croissance du milieu sans agent. Si possible, prélever un petit échantillon de chaque colonie.
2. Transférer dans un tube à bouchon à vis stérile 16 x 125 mm contenant 6 à 8 billes de verre ou de plastique et 3 mL de milieu liquide albumine-polysorbate 80 (bouillon Middlebrook 7H9).
3. Homogénéiser les cellules dans un mixeur de tube à essai pendant 5 à 10 min.
4. Laisser sédimenter les matières particulaires, retirer le surnageant et ajuster la densité avec de l'eau ou du sérum physiologique à 0,85 % stérile pour obtenir une turbidité correspondant à peu près à celle d'un standard MacFarland n° 1.
5. Diluer à 10<sup>-2</sup> à 10<sup>-4</sup> en effectuant des dilutions au 1/10ème successives avec de l'eau distillée ou du sérum physiologique à 0,85 %.
6. Pour l'ensemencement, procéder comme dans le " test direct ".

### D. Incubation

Après l'ensemencement, conserver les boîtes à l'abri de la lumière et les placer, milieu vers le bas, dans une jarre GasPak CO<sub>2</sub> ou dans un autre système fournissant une atmosphère aérobie enrichie à environ 3 à 10 % de CO<sub>2</sub> ; incubé entre 35 et 37 °C.

Si une perte d'humidité peut survenir pendant l'incubation, placer les boîtes dans des sacs plastiques perméables au CO<sub>2</sub> (en polyéthylène). Après avoir évacué l'air contenu dans les sacs, sceller les sacs avec du ruban adhésif ou un dispositif de thermoscellage, ou plier deux ou trois fois etagrafer.

Empiler les boîtes dans des sacs sans dépasser 6 boîtes par pile ; pour empêcher la condensation dans les boîtes pendant l'incubation, placer les boîtes en plastique sur une surface d'isolation, par exemple de la mousse de polystyrène ou plusieurs épaisseurs de carton, plutôt que de les laisser sur une étagère en métal ou un plateau ou dans un panier. Incuber les sacs de boîtes entre 35 et 37 °C dans une atmosphère aérobie enrichie d'environ 3 à 10 % de CO<sub>2</sub>.

Les tests de sensibilité peuvent être examinés après 5 à 7 jours à l'aide d'un microscope à dissection à faible grossissement et des observations préliminaires positives de culture peuvent être effectuées à ce moment.<sup>7</sup> Les résultats finaux doivent attendre au moins 3 semaines d'incubation car la croissance de mutants résistants peut être plus lente dans le milieu contenant l'agent que dans le milieu de contrôle.<sup>1,2</sup>

REMARQUE : Si l'on suspecte la présence de *M. marinum* , *M. ulcerans* ou *M. haemophilum* dans des échantillons provenant de lésions cutanées, l'isolement primaire doit s'effectuer par incubation à une température inférieure à 33 °C ; dans le cas de *M. avium* ou *M. xenopi*, la température idéale de croissance est de 40 à 42 °C.<sup>1</sup> Incuber un double de la culture entre 35 et 37 °C.

**Contrôle de qualité par l'utilisateur :** Vérifier la performance du milieu sans agent en ensemençant des cultures pures de souches de contrôle stables de mycobactéries produisant une réaction connue. Une souche sensible à l'agent de *M. tuberculosis* convient à la mise en évidence de l'activité des agents dans le milieu utilisé.<sup>2</sup>

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

### RESULTATS<sup>1</sup> – Test direct et indirect

Un test est considéré comme valide lorsqu'au moins 50 colonies sont présentes sur au moins un des milieux de contrôle.

1. Relever la croissance bactérienne sur les quadrants avec agent et de contrôle comme indiqué ci-dessous :

Croissance agglomérée (500 colonies ou plus)	4+
Croissance quasiment agglomérée (de 200 à 500 colonies)	3+
100 à 200 colonies	2+
50 à 100 colonies	1+
Moins de 50 colonies	Compte réel de colonies

2. Déterminer le pourcentage de bacilles résistants à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies sur le quadrant avec agent}}{\text{Nombre de colonies sur le quadrant de contrôle}} \times 100 = \% \text{ résistance}$$

Exemple de calcul

	Croissance		% Résistant
	Non dilué	10 <sup>-2</sup>	
Contrôle	4+	100	
INH 0,2 µg/mL	1+	10	10 %
SM 2,0 µg/mL	0	0	0 %
PAS 2,0 µg/mL	0	0	0 %
	$\frac{10 \text{ colonies}}{100 \text{ colonies}} \times 100 \% = 10 \% \text{ résistance}$		

REMARQUE : La taille des colonies des microorganismes se développant sur le milieu avec agent peut s'avérer ostensiblement plus petite que celle sur le milieu de contrôle, en particulier avec PAS ; c'est pourquoi les observations sont basées sur le nombre de colonies détectées et non sur leur taille.

### LIMITES DE LA PROCEDURE

1. Le test de sensibilité étant une comparaison de croissance entre les milieux avec agent et les milieux de contrôle, l'uniformité de l'inoculum de chaque culture doit être garantie. La

suspension uniforme de l'inoculum et l'absence d'agrégats de grande taille sont primordiaux.

2. La proportion de bactéries résistantes est susceptible de changer dans une sous-culture *in vitro* ; c'est pourquoi il est préférable d'utiliser l'échantillon traité comme inoculum pour le test de sensibilité direct à chaque fois que l'examen de frottis met en évidence des bacilles acido-résistants.
3. Si des tests de sensibilité directs sont effectués à partir de cultures présentant des colonies distinctes, l'inoculum doit être préparé à partir d'une sélection représentative ; tous les types de colonies doivent être échantillonnés.

## CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

### Disques d'éthambutol

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques d'éthambutol (EM-25 ou EM-50) sont testées en usine. La concentration d'éthambutol des échantillons représentatifs du lot est analysée. Les disques d'éthambutol (EM-25 ou EM-50) sont placés dans des tubes de centrifugeuse avec 5 mL d'eau traitée, 2 mL de bleu de bromothymol et 10 mL de benzène. Les tubes sont centrifugés pendant 5 min. La couche de benzène est ensuite transférée dans une cellule de 1 cm et l'absorption est mesurée sur un spectrophotomètre à ultraviolet. L'absorption de l'échantillon du test est comparée à celle d'une solution de contrôle constituée de 5 mL d'eau traitée, 2 mL de bleu de bromothymol et 10 mL de benzène. La puissance du disque est ensuite calculée.

### Disques d'isoniazide

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques d'isoniazide (INH-1 ou INH-5) sont testées en usine. La concentration d'isoniazide des échantillons représentatifs du lot est analysée. Les disques INH sont placés dans un ballon volumétrique et extraits à température ambiante avec 10 mL d'acide chlorhydrique 0,01 N. Après 18 à 24 h, les extraits sont filtrés. L'absorption de chaque extrait filtré est mesurée par spectrophotométrie ultraviolet. La solution de référence utilisée est HCl 0,01 N. La quantité d'isoniazide présente dans les disques est calculée en se basant sur l'absorption d'une solution de référence standard à la concentration appropriée (à 10 % près).

### Disques d'éthionamide

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques d'éthionamide (EA-25) sont testées en usine. La concentration d'éthionamide des échantillons représentatifs du lot est analysée. Les disques EA sont placés dans un ballon volumétrique et extraits à température ambiante avec 10 mL de méthanol pendant 18 à 24 h. L'absorption de chaque solvant est mesurée par spectrophotométrie ultraviolet. La solution de référence utilisée est le méthanol. La quantité d'éthionamide présente dans les disques est calculée en se basant sur l'absorption d'une solution de référence standard à la concentration appropriée (à 10 % près).

### Disques de streptomycine

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques de streptomycine (S-50) sont testées en usine. La concentration de streptomycine dans des échantillons représentatifs du lot est analysée par une procédure de dosage développée par BD Diagnostics qui se base sur le protocole concernant des agents antimicrobiens similaires dans le *Code of Federal Regulations*, Part 460 - Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs.

### Disques de rifampine

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques de rifampine (RA-25) sont testées en usine. La concentration de rifampine dans des échantillons représentatifs du lot est analysée par une procédure de dosage développée par BD Diagnostics qui se base sur le protocole concernant des agents antimicrobiens similaires dans le *Code of Federal Regulations*, Part 460 - Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs.

### Disques d'acide *p*-aminosalicylique

Les caractéristiques de performances de tous les lots de disques d'acide *p*-aminosalicylique (PAS-10 ou PAS-50) sont testées en usine. La concentration d'acide *p*-aminosalicylique des échantillons représentatifs du lot est analysée. Les disques PAS sont placés dans un ballon volumétrique et extrait à température ambiante avec 10 mL d'acide chlorhydrique 0,1 N (HCl). Après 18 à 24 h, l'absorption de chaque extrait est déterminée par spectrophotométrie ultraviolet. La solution de référence utilisée est HCl 0,1 N. La quantité d'acide *p*-aminosalicylique présente dans les disques est calculée en se basant sur l'absorption d'une solution de référence standard à la concentration appropriée (à 10 % près).

## CONDITIONNEMENT

No réf.	Description
231570	<b>BBL Sensi-Disc</b> Streptomycin, 50 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231571	<b>BBL Sensi-Disc</b> Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine), 1 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231572	<b>BBL Sensi-Disc</b> Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine), 5 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231573	<b>BBL Sensi-Disc</b> <i>P</i> -Aminosalicylic Acid, 10 µg, cartouche unique de 50 disques
231574	<b>BBL Sensi-Disc</b> <i>P</i> -Aminosalicylic Acid, 50 µg, cartouche unique de 50 disques
231575	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethambutol, 25 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231576	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethambutol, 50 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231577	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethionamide, 25 µg, cartouche unique de 50 disques C€
231578	<b>BBL Sensi-Disc</b> Rifampin, 25 µg, cartouche unique de 50 disques C€

**REFERENCES** : Voir la section " References " dans la notice en anglais.

# **BD BBL Sensi-Disc Antibiotika-Blättchen**

## zur Verwendung in Kulturmedien

Deutsch

Antibiotikum	Code	Konz.
Streptomycin	*S-50	50 µg
Isoniazid (Isonicotinylhydrazin)	INH-1	1 µg
	INH-5	5 µg
p-Aminosalicylsäure	PAS-10	10 µg
	PAS-50	50 µg
Ethambutol**	EM-25	25 µg
	EM-50	50 µg
Ethionamid***	EA-25	25 µg
Rifampin	*RA-25	25 µg

### VERWENDUNGSZWECK

Diese Blättchen sind für qualitative Empfindlichkeitsprüfungen in Kulturmedien bestimmt. Sie stellen eine praktische Methode der Antibiotikazugabe zu Kulturmedien dar, besonders für qualitative Studien von Mykobakterien und verwandten Organismen.

Bestimmte Empfindlichkeitsprüfungsblättchen, d.h. Streptomycin, 10 µg, Kanamycin, 30 µg und Rifampin, 5 µg, werden ebenfalls für dieses Verfahren empfohlen.<sup>1,2</sup>

Diese Blättchen werden bemessenen Mengen an verflüssigtem Agarmedium, wie z.B. Middlebrook und Cohn 7H10 Agar oder Seven H11 Agar, zugesetzt, um die empfohlenen Antibiotikakonzentrationen im verfestigten Agar zu erhalten.<sup>2</sup>

Mit diesen Blättchen können **Falcon X Plate**-Petrischalen mit vier Abteilungen verwendet werden. Drei Abteilungen können für verschiedene Wirkstoffe oder verschiedene Konzentrationen des selben Wirkstoffs genutzt werden und die vierte Abteilung als wirkstofffreie Kontrolle.

\* Nicht für herkömmliche (Bauer-Kirby oder standardisierte) Blättchenempfindlichkeitsprüfungen verwenden.

\*\* Myambutol: Wyeth Laboratories

\*\*\* Trecator: Wyeth Laboratories

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Seit dem Nachweis des Tuberkelbazillus als Erreger der Tuberkulose durch Koch im Jahre 1882 hat man mit einer Reihe verschiedener Medien und Methoden versucht, die erforderliche Zeitspanne für die Isolierung und die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung zu reduzieren.

Bei unter dem Mikroskop bzw. durch Kulturen nachgewiesenen säurefesten Bazillen aus Humanproben handelt es sich gewöhnlich um *Mycobacterium tuberculosis*. Jedoch können auch andere pathogene und evtl. nicht pathogene säurefeste Organismen vorliegen. Derartige "atypische" oder "nicht klassifizierte" Mykobakterien müssen vom Labor erkannt und bestimmt werden, da die Prognose und das Anschlagen einer Antibiotikatherapie bei durch diese Organismen hervorgerufenen Erkrankungen stark unterschiedlich ist.

Die Blättchenempfindlichkeitsmethode mit Blättchen in Kulturmedien hat sich in zahlreichen Labors als wertvolles und zuverlässiges Hilfsmittel erwiesen.<sup>3-5</sup> Die unkomplizierte Vorbereitung des Blättchenmediums, die mühelose und sparsame Vorbereitung einer beliebigen Anzahl von Testplatten, die Antibiotikastabilität in getrockneten Blättchen, die Eliminierung möglicher Fehler beim Verdünnen und Abmessen von Antibiotikallösungen sowie die sofortige Erkennbarkeit des in jedem Medium vorliegenden Antibiotikums samt Konzentration durch codierte Blättchen macht dies zu einer beliebten Technik. Es wird lediglich ein Medium vorbereitet; die verschiedenen Antibiotika und deren Konzentrationen liegen in den Blättchen vor.

### VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Diese Blättchen dienen zum Imprägnieren der gesamten Agarfläche mit einer spezifischen Konzentration eines Antibiotikums. Dazu wird zunächst das Blättchen in der Mitte des Plattenquadranten angebracht und anschließend eine bemessene Agarmenge hinzugegeben. Die Platte wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt, um die Diffusion durch das Medium zu ermöglichen. Danach wird die Platte mit dem Testorganismus inokuliert. Wachstum stellt sich ein oder bleibt aus, je nachdem, ob der Organismus gegenüber dem Antibiotikum in der im Quadranten vorliegenden Konzentration resistent oder empfindlich ist. Da sich keine Zonen ausbilden, ist die Antibiotikaempfindlichkeit aus der Anzahl der Kolonien bzw. dem ausbleibenden Wachstum in den einzelnen Quadranten ersichtlich.

### REAGENZIEN

Die **Sensi-Disc**-Blättchen werden vorbereitet, indem qualitativ hochwertiges saugfähiges Papier mit genau bemessenen Mengen von antimikrobiellen Wirkstoffen imprägniert wird. Die Blättchen besitzen auf beiden Seiten eindeutig erkennbare Buchstaben und Ziffern zur Identifizierung des Antibiotikums und zur Angabe der verwendeten Wirkstoffmenge. Die **Sensi-Disc**-Wirkstoffe werden in Kartuschen zu jeweils 50 Blättchen geliefert. Das letzte Blättchen in jeder Kartusche ist mit einem "X" gekennzeichnet und enthält das durch den Code ausgewiesene Antibiotikum. Die Kartuschen werden in Einzelblättchen-Dispensiergeräten verwendet.

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

*In-vitro*-Diagnostikum.

Der Umgang mit mikrobiologischem Material sollte bei allen Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise und der allgemein üblichen Vorsichtsmaßnahmen erfolgen.<sup>1,6</sup> Sämtliche Manipulationen in einer biologischen Sicherheitswerkbank vornehmen. Nach Gebrauch Kulturen, Behälter und andere kontaminierte Materialien sterilisieren.

Bei Arbeiten mit klinischen Proben, bei denen keine Aerosole entstehen - wie bei der Herstellung von säurefesten Ausstrichen - sind Laborpraktiken und Verfahren sowie Sicherheitsvorrichtungen der Biosicherheitsstufe 2 erforderlich. Alle Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen, müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse I oder II durchgeführt werden. Verfahren, Behälter und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 3 sind für Laboraktivitäten zur Vermehrung und Manipulation von *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Kulturen einzusetzen. Darüber hinaus erfordern Tierstudien ebenfalls besondere Verfahren.<sup>6</sup>

## Aufbewahrung:

1. Die Behälter mit den Blättchen nach Erhalt bei -20 bis +8 °C aufbewahren. Wird der Laborkühlschrank häufig geöffnet und geschlossen und eine geeignete Temperatur kann nicht aufrechterhalten werden, nur die für eine Woche ausreichende Blättchenmenge in diesem Kühlschrank lagern.
2. Behälter vor dem Öffnen auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach dem Dispensieren die unbenutzten Blättchen wieder im Kühlschrank aufbewahren.
3. Die ältesten Blättchen zuerst verwenden.

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

## PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG<sup>1,2</sup>

Proben und aufgeschlossene, konzentrierte Proben, wie z.B. Sputum, Flüssigkeit aus Magenspülungen, Urin, Flüssigkeit aus dem Pleuraraum, Liquor, Gelenkschmiere und sonstige Flüssigkeiten, Exsudate und Gewebe, in denen säurefeste Bazillen auf Ausstrichen erkennbar sind, können für die direkte Empfindlichkeitsprüfmethode herangezogen werden. Aus Proben gewonnene Kulturen können mit der indirekten Methode geprüft werden.

## VERFAHREN

**Mitgelieferte Materialien:** Diese Packung enthält die angegebenen **Sensi-Disc**-Antibiotika-Blättchen zur Verwendung in Kulturmedien.

### Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:

1. Middlebrook und Cohn 7H10 Agar-Basis oder Seven H11 Agar-Basis und Middlebrook OADC Enrichment
2. Wasserbad (ca. 45 °C)
3. Platten mit vier Abteilungen (100 x 15 mm)
4. Einzelstellen-Dispensiergeräte oder Pinzette
5. Bunsenbrenner, mit Gasanschluss
6. Impföse aus 24 bis 26 G starkem Platin- oder Nichrom-Draht in einem standardmäßigen bakteriologischen Drahtösenhalter. Der Draht ist zu einer geschlossenen Öse von zwei oder drei mm Durchmesser geformt und besitzt einen ca. 6,35 cm langen Schaft.
7. Inkubator (35 °C oder sonstige geeignete Temperatur)
8. **Cornwall**-Pipette (steril, 10 mL) oder ein sonstiger Pipettentyp, mit dem ca. 5 mL Medium pipettiert werden können
9. säurefeste Färbungsreagenzien und -gerätschaften
10. schwache Mikroskope (bzw. Dissektionsmikroskope) und Immersionsöl
11. steriles destilliertes Wasser oder 0,85%ige Kochsalzlösung (Volumina von 4,5 mL in Röhrchen mit Schraubverschlüssen)
12. Pipetten (1 mL) und Pasteur-Kapillare
13. Röhrchen mit Schraubverschlüssen (16 x 125 mm)
14. Glas- oder Kunststoffperlen (1 bis 2 mm Durchmesser) oder stark hitzebeständige "Highheat"-Polystyrolkugeln, wie bspw. Styron 700\* (27 klar, Nr.7)
15. Middlebrook 7H9-Bouillon
16. Teströhrchenmischgerät
17. MacFarland-Standard Nr. 1 (hergestellt durch Zugabe von 0,1 mL 1%igem BaCl<sub>2</sub> zu 9,9 mL 1%igem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
18. **GasPak**-System mit einem **GasPak** Disposable Carbon Dioxide Generator Envelope (Einmal-Hülle mit Kohlendioxid-Generator), belüftetes **GasPak**-System, CO<sub>2</sub>-Inkubator oder sonstiges geeignetes System für die Inkubation in einer mit CO<sub>2</sub> angereicherten aeroben Atmosphäre.

\* Marke der Dow Chemical Co.

## Testverfahren:

### A. Plattenvorbereitung

1. Die benötigte Menge an komplettem sterilem Medium vorbereiten. Es sollte flüssig und ca. 50 °C warm sein.
2. Mit Einzelstellen-Dispensiergeräten oder einer sterilen Pinzette die Blättchen mittig in drei der Plattenquadranten platzieren. Der vierte Quadrant dient als wirkstofffreie Kontrolle.
3. Die Blättchen in den Quadrantenmitten anbringen; dazu jeweils ein oder zwei Tropfen des Mediums hinzugeben. Wird das Medium über eine Hohnadel (wie bspw. bei der **Cornwall**-Pipette) hinzugegeben, können die Blättchen zur Fixierung mit dem Medium umrandet werden. Die kleine Agarmenge sollte sofort gelieren.
4. Den Rest der 5 mL Medium in jeden Quadranten geben. So ergibt sich pro mL Medium eine Antibiotikakonzentration von einem Fünftel des Blättchengehalts.
5. Die Platten über Nacht in den Kühlschrank stellen, um die Diffusion durch das Medium zu ermöglichen.
6. Die Platten wie im Folgenden beschrieben inokulieren.

### B. Direkte Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung<sup>1</sup>

Die direkte Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung wird an Proben durchgeführt, in denen säurefeste Bazillen (AFB) anhand eines Ausstrichs der aufgeschlossenen konzentrierten Probe nachgewiesen werden können.

1. Die Ausstriche konzentrierter klinischer Proben färben und auswerten. Dabei die durchschnittliche AFB-Anzahl pro Immersionsölfeld aufzeichnen (ca. 20 positive Felder beurteilen).
2. Auf der Basis der positiven Ausstrichergebnisse wie folgt Verdünnungen der aufgeschlossenen Probe wählen:

Mikroskopische Untersuchung	Inokulat
weniger als 1 AFB/Feld	unverdünnt und 10 <sup>-2</sup> (1:100)
1 - 10 AFB/Feld	10 <sup>-1</sup> und 10 <sup>-3</sup> (1:10 und 1:1000)
mehr als 10 AFB/Feld	10 <sup>-2</sup> und 10 <sup>-4</sup> (1:100 und 1:10.000)

3. Die angegebenen Verdünnungen mit 0,5 mL der aufgeschlossenen Probe und 4,5 mL sterilem Wasser oder Kochsalzlösung herstellen. Nacheinander 0,5 bis 4,5 mL für die erforderlichen Verdünnungen mischen und transferieren.

- Mit Hilfe einer Kapillarpipette jeden Antibiotikumquadranten und das Kontrollmedium mit 3 Tropfen inokulieren. Es werden zwei Inokulumverdünnungen (die sich gewöhnlich um 1/100 unterscheiden) auf Doppelbestimmungsplatten des Mediums gegeben.

### C. Indirekte Prüfung<sup>1</sup>

Sofern möglich sollte die direkte Prüfung durchgeführt werden. Die indirekte Prüfung verwendet als Inokulum Mykobakterienwachstum von einer Primärkultur mit einer wirkstofffreien Flüssigkeit oder von einem festen Medium und ist unter folgenden Umständen indiziert:

- Der Ausstrich war negativ und die Primärkultur zeigt Wachstum.
- Das Wachstum auf der Kontrolle der direkten Prüfung ist unzureichend für einen zuverlässigen Bericht.
- Es geht eine Referenzkultur von einem anderen Labor ein.

Damit die Prüfung gültig ist, muss das Inokulum umfangreich genug (50 – 100 Kolonien im Kontrollquadranten) für gutes Wachstum sein, jedoch nicht groß genug, um eine Antibiotikaresistenz auf Grund des Wachstums spontan auftretender antibiotikaresistenter Mutationen zu stimulieren.

- Circa 2 bis 5 mg Wachstum vom wirkstofffreien Medium abnehmen. Nach Möglichkeit einen kleinen Anteil jeder Kolonie aufnehmen.
- In ein steriles Röhrchen mit Schraubverschluss (16 x 125 mm) transferieren, das 6 bis 8 Glas- oder Kunststoffperlen sowie 3 mL Polysorbat 80-Albumin-Flüssigmedium (Middlebrook 7H9-Bouillon) enthält.
- Die Zellen in einem Teströhrchenmischgerät 5 bis 10 min lang mischen.
- Die großen Partikel absetzen lassen, den Überstand abziehen und die Dichte mit sterilem Wasser oder 0,85%iger steriler Kochsalzlösung auf den MacFarland-Standard 1 einstellen.
- Auf 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-4</sup> verdünnen; dazu zehnfache Serienverdünnungen in sterilem destilliertem Wasser oder in 0,85%iger Kochsalzlösung anfertigen.
- Zum Inokulieren vorgehen, wie für die "Direkte Prüfung" beschrieben.

### D. Inkubieren

Die Platten nach der Inokulation vor Licht schützen und mit der Mediumseite nach unten in ein GasPak-CO<sub>2</sub>-Glas oder ein sonstiges geeignetes System geben, das eine mit ca. 3 bis 10 % CO<sub>2</sub> angereicherte aerobe Atmosphäre bietet, und bei 35 bis 37 °C inkubieren.

In Fällen, in denen es im Verlauf der Inkubation zu Feuchtigkeitsverlusten kommen kann, die Platten in CO<sub>2</sub>-durchlässige Kunststoffbeutel (aus Polyethylen) geben. Die Luft aus den Beuteln drücken und die Beutel anschließend mit Klebeband oder mehreren Pappkartonlagen oder dergl., platzieren und nicht unmittelbar auf bzw. in metallenen Regalfächern, Schalen oder Körben.

In den Beuteln nicht mehr als 6 Platten übereinander stapeln. Um während der Inkubation die Ansammlung von Feuchtigkeitströpfchen in den Platten zu verhindern, die Kunststoffplatten auf einer isolierenden Fläche, wie bspw. Styropor oder mehreren Pappkartonlagen oder dergl., platzieren und nicht unmittelbar auf bzw. in metallenen Regalfächern, Schalen oder Körben.

Die Beutel mit den Platten in einer aeroben und mit ca. 3 bis 10 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre bei 35 bis 37 °C inkubieren.

Antibiotikaempfindlichkeitsprüfungen können nach 5 bis 7 Tagen unter einem schwachen Dissektionsmikroskop untersucht werden; ein vorläufiger Bericht positiver Kulturbefunde kann zum Zeitpunkt der ersten Begutachtung ausgegeben werden.<sup>7</sup> Die endgültige Ergebnisausgabe sollte erst nach 3-wöchiger Inkubation erfolgen, da das Wachstum resistenter Mutationen auf wirkstoffhaltigen Medien evtl. langsamer erfolgt als auf der Kontrolle.<sup>1,2</sup>

**HINWEIS:** Kulturen von Hautläsionen, bei denen es sich vermutlich um *M. marinum*, *M. ulcerans* oder *M. haemophilum* handelt, sind zur ersten Isolierung bei Temperaturen bis maximal 33 °C zu inkubieren. Kulturen, bei denen es sich vermutlich um *M. avium* oder *M. xenopi* handelt, zeigen optimales Wachstum bei 40 bis 42 °C.<sup>1</sup> Eine Doppelbestimmungskultur bei 35 bis 37 °C inkubieren.

**Qualitätssicherung durch den Anwender:** Die Leistung des wirkstofffreien Mediums durch Inokulation mit Reinkulturen stabiler Mykobakterien-Kontrollstämme, die bekannte gewünschte Reaktionen ergeben, überprüfen Ein antibiotikaempfindlicher *M. tuberculosis*-Stamm ist als Kontrolle zufriedenstellend, wenn die Wirkstoffaktivität in den verwendeten Medien nachgewiesen werden soll.<sup>2</sup>

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

### ERGEBNISSE<sup>1</sup> – Direkte und Indirekte Prüfungen

Eine Prüfung gilt dann als gültig, wenn auf mindestens einer der Kontrollen wenigstens 50 Kolonien vorliegen.

- Das Bakterienwachstum auf der Kontrolle und auf den Wirkstoff enthaltenden Mediumquadranten wie folgt aufzeichnen:

konfluierend (mindestens 500 Kolonien)	4+
nahezu konfluierend (200 - 500 Kolonien)	3+
100 - 200 Kolonien	2+
50 - 100 Kolonien	1+
weniger als 50 Kolonien	tatsächliche Kolonienanzahl

- Den Prozentsatz an resistenten Bazillen anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien auf dem Wirkstoffquadranten}}{\text{Anzahl der Kolonien auf dem Kontrollquadranten}} \times 100 = \text{Resistenzprozentatz}$$

Probenberechnung	Wachstum		Resistenzprozentatz
	Unverdünnt	10 <sup>-2</sup>	
Kontrolle	4+	100	
INH 0,2 µg/mL	1+	10	10 %
SM 2,0 µg/mL	0	0	0 %
PAS 2,0 µg/mL	0	0	0 %
$\frac{10 \text{ Kolonien}}{100 \text{ Kolonien}} \times 100 \% = 10 \% \text{ resistent}$			

**HINWEIS:** Die Koloniengröße der auf den Wirkstoffmedien wachsenden Organismen kann erheblich kleiner ausfallen als auf der Kontrolle, besonders bei PAS. Daher stützt sich die Auswertung auf die Anzahl der zu beobachtenden Kolonien und nicht auf deren Größe.

## VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

1. Da die beobachtete Antibiotikaempfindlichkeit ein Vergleich der Wachstumsmengen auf dem Kontrollmedium und den Wirkstoffmedien ist, muss das Inokulum für jede Kultur von erwiesener Gleichförmigkeit sein. Das gleichmäßige Suspendieren des Inokulums und die Vermeidung größerer Klumpen sind unerlässlich.
2. Da bei Subkulturen *in vitro* die Proportion der resistenten Bakterien anders ausfallen kann, sind direkte Empfindlichkeitsprüfungen unter Heranziehung der aufbereiteten Probe als Inokulum stets vorzuziehen, wenn eine Ausstrichuntersuchung säurefeste Bazillen nachweist.
3. Werden indirekte Empfindlichkeitsprüfungen an Kulturen mit separaten Kolonien durchgeführt, muss das Inokulum ein vollständiges repräsentatives Spektrum darstellen - es sind Proben von allen sichtbaren Kolonietypen zu nehmen.

## LEISTUNGSMERKMALE

### Ethambutol-Blättchen

Vor der Freigabe werden alle Chargen der Ethambutol-Blättchen (EM-25 bzw. EM-50) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Ethambutol-Konzentration getestet. Die Ethambutol-Blättchen (EM-25 bzw. EM-50) werden gemeinsam mit 5 mL demineralisiertem Wasser, 2 mL Bromthymolblau und 10 mL Benzol in Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Röhrchen werden 5 min lang zentrifugiert. Anschließend wird die Benzolschicht in eine 1-cm-Zelle transferiert und die Extinktion mit einem UV-Spektralphotometer gemessen. Die Extinktion der Testprobe wird mit der einer Kontrolllösung verglichen, die aus 5 mL demineralisiertem Wasser, 2 mL Bromthymolblau und 10 mL Benzol besteht. Anschließend wird die Blättchenpotenz berechnet.

### Isoniazid-Blättchen

Vor der Freigabe werden alle Chargen der Isoniazid-Blättchen (INH-1 bzw. INH-5) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Isoniazid-Konzentration getestet. Die INH-Blättchen werden in einen Messkolben gegeben und bei Raumtemperatur mit 10 mL Salzsäure (0,01 N) extrahiert. Nach 18 bis 24 h werden die Extrakte filtriert. Die Extinktionen der einzelnen filtrierten Extrakte werden mittels UV-Spektralphotometrie bestimmt. Als Referenzlösung wird 0,01 N HCl verwendet. Die in den Blättchen vorliegende Isoniazid-Menge wird anhand der Extinktion einer Referenz-Standardlösung (innerhalb von 10 %) der gewünschten Konzentration berechnet.

### Ethionamide-Blättchen

Vor der Freigabe werden alle Chargen der Ethionamide-Blättchen (EA-25) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Ethionamide-Konzentration getestet. Die EA-Blättchen werden in einen Messkolben gegeben und bei Raumtemperatur mit 10 mL Methanol 18 bis 24 h lang extrahiert. Die Extinktionen der einzelnen Extraktionslösungsmittel werden mittels UV-Spektralphotometrie bestimmt. Als Referenzlösung wird Methanol verwendet. Die in den Blättchen vorliegende Ethionamide-Menge wird anhand der Extinktion einer Referenz-Standardlösung (innerhalb von 10 %) der gewünschten Konzentration berechnet.

### Streptomycin-Blättchen

Vor der Freigabe werden alle Chargen der Streptomycin-Blättchen (S-50) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Streptomycin-Konzentration getestet, und zwar mit einem von BD Diagnostics entwickelten Assay-Verfahren, das sich auf ein Protokoll für ähnliche Antibiotika in folgender Veröffentlichung stützt: *Code of Federal Regulations, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs*.

### Rifampin-Blättchen

Vor der Freigabe werden alle Chargen der Rifampin-Blättchen (RA-25) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Rifampin-Konzentration getestet, und zwar mit einem von BD Diagnostics entwickelten Assay-Verfahren, das sich auf ein Protokoll für ähnliche Antibiotika in folgender Veröffentlichung stützt: *Code of Federal Regulations, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs*.

### P-Aminosalicylic Acid-Blättchen (p-Aminosalicylsäure-Blättchen)

Vor der Freigabe werden alle Chargen der P-Aminosalicylic Acid-Blättchen (PAS-10 bzw. PAS-50) im Hinblick auf spezifische Produkteigenschaften geprüft. Repräsentative Proben der Charge werden im Hinblick auf ihre Konzentration an p-Aminosalicylsäure getestet. Die PAS-Blättchen werden in einen Messkolben gegeben und bei Raumtemperatur mit 10 mL Salzsäure (0,1 N) extrahiert. Nach 18 bis 24 h wird die Extinktion jedes einzelnen Extraktes mittels UV-Spektralphotometrie bestimmt. Als Referenzlösung wird 0,1 N HCl verwendet. Die in den Blättchen vorliegende Menge an p-Aminosalicylsäure wird anhand der Extinktion einer Referenz-Standardlösung (innerhalb von 10 %) der gewünschten Konzentration berechnet.

## LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
231570	<b>BBL Sensi-Disc</b> Streptomycin, 50 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231571	<b>BBL Sensi-Disc</b> Isoniazid (Isonicotinylhydrazin), 1 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231572	<b>BBL Sensi-Disc</b> Isoniazid (Isonicotinylhydrazin), 5 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231573	<b>BBL Sensi-Disc</b> P-Aminosalicylic Acid, 10 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen
231574	<b>BBL Sensi-Disc</b> P-Aminosalicylic Acid, 50 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen
231575	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethambutol, 25 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231576	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethambutol, 50 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231577	<b>BBL Sensi-Disc</b> Ethionamide, 25 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€
231578	<b>BBL Sensi-Disc</b> Rifampin, 25 µg, Einzel-Kartusche zu 50 Blättchen €€

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

# **BD Dischi antibiotati BBL Sensi-Disc** per uso nei terreni di coltura

Italiano

Antibiotico	Codice	Con.
Streptomicina	*S-50	50 µg
Isoniazide (idrazide isonicotinica)	INH-1	1 µg
	INH-5	5 µg
Acido <i>p</i> -aminosalicilico	PAS-10	10 µg
	PAS-50	50 µg
Etambutolo**	EM-25	25 µg
	EM-50	50 µg
Etionamide***	EA-25	25 µg
Rifampicina	*RA-25	25 µg

## USO PREVISTO

Questi dischi trovano impiego nelle metodiche di determinazione qualitativa della sensibilità nei terreni di coltura e sono utili per facilitare la dispensazione di agenti antibiotici nei terreni di coltura, in particolare per gli studi qualitativi di micobatteri e microrganismi associati.

Per questa procedura, si consiglia anche l'uso di alcuni dischi per test di sensibilità, come streptomicina, 10 µg, canamicina, 30 µg e rifampicina, 5 µg.<sup>1,2</sup>

Per preparare le concentrazioni consigliate di antibiotico in agar solidificato,<sup>2</sup> i dischi vengono aggiunti ad aliquote misurate di supporto agar liquefatto, come agar Middlebrook e Cohn 7H10 o agar Seven H11.

Con questi dischi è possibile usare piastre di Petri **Falcon X Plate** a quattro quadranti. Tre quadranti sono utilizzabili per vari antibiotici o per diverse concentrazioni dello stesso antibiotico, mentre il quarto quadrante serve da controllo senza farmaco.

\* Non per impiego in test convenzionali di sensibilità su disco.

\*\* Myambutol: Wyeth Laboratories

\*\*\* Trecator: Wyeth Laboratories

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Dal 1882, quando Koch dimostrò che la tubercolosi è causata dal bacillo tubercolare, sono stati studiati vari terreni e metodi per ridurre i tempi necessari per l'isolamento e i test di sensibilità ai farmaci.

I bacilli acido-resistenti da campioni umani, evidenziati mediante esame microscopico o colture, sono generalmente *Mycobacterium tuberculosis*; è possibile tuttavia individuare altri microrganismi acido-resistenti patogeni anche non patogeni. È importante che questi micobatteri "atipici" o "non classificati" vengano identificati e caratterizzati in laboratorio, in quanto causano malattie con prognosi e risposta alla farmacoterapia molto diverse.

È stato dimostrato che questo metodo di determinazione della sensibilità mediante dischi in terreni di coltura è uno strumento utile e affidabile per molti laboratori.<sup>3-5</sup> La semplicità di preparazione del terreno per i dischi, il pratico ed economico allestimento di qualsiasi numero di piastre per test, la stabilità dei farmaci nei dischi secchi, l'eliminazione di possibili errori di diluizione e misurazione delle soluzioni dei farmaci e l'immediata individuazione del farmaco e della rispettiva concentrazione presente in ciascun terreno mediante dischi codificati, sono tutti fattori che rendono questa tecnica particolarmente conveniente. Basta preparare un singolo terreno; i dischi forniscono i vari farmaci e le rispettive concentrazioni.

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Questi dischi vengono utilizzati per impregnare l'intero agar con una concentrazione specifica di antibiotico. A tale scopo, si dispone prima il disco al centro del quadrante della piastra e si aggiunge quindi un'aliquota misurata di agar. La piastra viene messa in frigorifero dove viene lasciata durante la notte per consentire la diffusione nel terreno. Successivamente, si inocula la piastra con il microrganismo da testare. La presenza o assenza di crescita dipenderà dalla resistenza o sensibilità del microrganismo all'agente antibiotico e dalla concentrazione impiegata nel quadrante. Dato che non si formano zone, la sensibilità al farmaco viene stabilita in base al numero di colonie o all'assenza di crescita su ciascun quadrante.

## REAGENTI

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

## Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici.<sup>1,6</sup> Eseguire tutte le procedure di lavorazione in cappa di sicurezza biologica. Dopo l'uso, sterilizzare le colture, i contenitori e i materiali contaminati.

Per le procedure di manipolazione su campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* e *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.<sup>6</sup>

## Modalità di conservazione

1. Al ricevimento, conservare i contenitori dei dischi tra -20 e +8 °C. Se il frigorifero del laboratorio viene aperto e chiuso di frequente e non riesce a mantenere una temperatura idonea, conservarvi soltanto una quantità di dischi sufficiente per una settimana.
2. Prima dell'apertura, attendere che i contenitori raggiungano la temperatura ambiente. Una volta completata l'applicazione dei dischi, rimettere in frigorifero quelli non utilizzati.
3. Usare prima i dischi più vecchi.

**Deterioramento del prodotto** - Eliminare i dischi scaduti. Eliminare anche le cartucce da cui sono stati tolti dischi frequentemente nel giro di una settimana e i contenitori lasciati fuori di notte nel laboratorio, oppure testare i dischi per accertarne le prestazioni. La data di scadenza

vale per i dischi conservati secondo le istruzioni in contenitori integri. Non aprire fino al momento dell'uso.

## RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI<sup>1,2</sup>

Per il test della sensibilità con il metodo diretto, è possibile usare prelievi e campioni digeriti concentrati, come sputo, lavaggio gastrico, urina, liquido pleurico, spinale, articolare o di altra origine, essudati e tessuti, nei cui strisci siano visibili i bacilli acido-resistenti. Le colture da prelievi e campioni possono essere testate con il metodo indiretto.

## PROCEDURA

**Materiali forniti** - Questa confezione contiene dischi antibiotati **Sensi-Disc** da usare nei terreni di coltura indicati sulle rispettive etichette.

### Materiali necessari ma non forniti

1. Agar base Middlebrook e Cohn 7H10, oppure agar base Seven H11 e arricchimento Middlebrook OADC.
2. Bagnomaria, circa 45 °C.
3. Piastre a quattro quadranti da 100 x 15 mm.
4. Pinze o dispenser a monoposto.
5. Becco Bunsen collegato ad una presa di gas.
6. Ansa per inoculo in platino calibro 24 – 26 o filo di nicromo inserito in un supporto standard per anse batteriologiche in metallo. Il filo è sagomato come un'ansa "chiusa" con diametro di 2 o 3 mm, con uno stelo lungo circa 6,35 mm.
7. Incubatore, a 35 °C o altra temperatura adatta.
8. Pipetta **Cornwall**, sterile, da 10 mL, o un altro tipo di pipetta per dispensare circa 5 mL di terreno.
9. Reagenti e attrezzatura per colorazione acido-resistente.
10. Microscopi, a bassa potenza (o da dissezione) e con un obiettivo a immersione in olio.
11. Acqua purificata sterile o soluzione fisiologica allo 0,85%, volumi da 4,5 mL in provette con tappo a vite.
12. Pipette da 1 mL e pipette Pasteur capillari.
13. Provette da 16 x 125 mm con tappi a vite.
14. Palline di vetro o di plastica, con diametro da 1 a 2 mm o palline di polistirolo per alta temperatura, come \*Styrone 700, trasparente 27, n. 7.
15. Brodo Middlebrook 7H9.
16. Miscelatore per provette.
17. Standard MacFarland n. 1 (preparato aggiungendo 0,1 mL di BaCl<sub>2</sub> all'1% a 9,9 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> all'1%).
18. Per l'incubazione in atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub>, un sistema **GasPak** funzionante con la busta monouso per lo sviluppo di anidride carbonica **GasPak**, un sistema ventilato **GasPak**, un incubatore per anidride carbonica o altri sistemi adatti.

\* Marchio di fabbrica di Dow Chemical Co.

## Procedura del test

### A. Preparazione delle piastre

1. Preparare la quantità richiesta di terreno sterile completo. Il terreno deve essere liquido e ad una temperatura di circa 50 °C.
2. Utilizzando dispenser singoli o pinze sterili, disporre i dischi al centro di tre quadranti della piastra; il quarto quadrante serve da controllo senza farmaci.
3. Per fissare i dischi al centro dei quadranti, dispensare su ciascuno una o due gocce di terreno. Se il terreno viene dispensato attraverso un ago, come una pipetta **Cornwall**, è possibile circondare i dischi con il terreno per trattenerli in posizione. La piccola quantità di agar deve gelificare immediatamente.
4. Dispensare in ciascun quadrante i rimanenti 5 mL di terreno. La concentrazione di agente antibiotico per mL di terreno risulterà pari ad un quinto di quella del contenuto del disco.
5. Mettere le piastre in frigorifero e lasciarvele durante la notte, per consentire la diffusione nel terreno.
6. Inoculare le piastre come descritto qui di seguito.

### B. Test diretto di sensibilità ai farmaci<sup>1</sup>

Il test diretto di sensibilità ai farmaci viene eseguito su un campione in cui la presenza di bacilli acido-resistenti (AFB) può essere dimostrata su uno striscio del campione digerito concentrato.

1. Eseguire la colorazione e la lettura degli strisci di campioni clinici concentrati e registrare il numero medio di bacilli acido-resistenti individuati per campo in olio da immersione (osservare circa 20 campi positivi).
2. Selezionare come segue le diluizioni del digerito di campioni in base ai risultati dello striscio.

Microscopia	Inoculo
Meno di 1 AFB/campo	Non diluito e 10 <sup>-2</sup> (1:100)
Da 1 a 10 AFB/campo	10 <sup>-1</sup> e 10 <sup>-3</sup> (1:10 e 1:1000)
Più di 10 AFB/campo	10 <sup>-2</sup> e 10 <sup>-4</sup> (1:100 e 1:10,000)

3. Eseguire le diluizioni indicate con 0,5 mL del digerito di campione e 4,5 mL di acqua sterile o soluzione fisiologica sterile. Mescolare e trasferire in sequenza 0,5 mL a 4,5 mL per ottenere le diluizioni richieste.
4. Con una pipetta capillare, inoculare 3 gocce su ciascun quadrante dei terreni con i farmaci e con il controllo. Due diluizioni di inoculo, generalmente distanziate cento volte le rispettive dimensioni, vengono introdotte su piastre duplicate di terreno.

### C. Test indiretto<sup>1</sup>

Se possibile, eseguire il test diretto. Il test indiretto utilizza come inoculo la crescita micobatterica da una coltura primaria su terreno liquido o solido senza farmaci ed è indicata quando:

1. lo striscio è risultato negativo e la coltura primaria presenta una crescita.
2. la crescita sul controllo del test diretto è insufficiente per un referto affidabile.
3. una coltura di riferimento proviene da un altro laboratorio.

Perché il test sia valido, le dimensioni dell'inoculo devono essere sufficienti (50 - 100 colonie sul quadrante di controllo) per una buona crescita, ma non eccessive da stimolare una resistenza al farmaco dovuta alla crescita di mutanti farmacoresistenti di origine spontanea.

1. Rimuovere circa 2 – 5 mg di crescita dal terreno senza farmaci. Se possibile, prelevare una piccola aliquota da ciascuna colonia.
2. Trasferire la crescita in una provetta sterile da 16 x 125 mm, con tappo a vite, contenente 6 – 8 palline di vetro o di plastica e 3 mL di terreno liquido polisorbato 80-albumina (brodo Middlebrook 7H9).
3. Omogeneizzare le cellule per 5 – 10 min in un miscelatore per provette.
4. Lasciare depositare le particelle macroscopiche, estrarre il sovrantante e regolare la densità ad uno standard MacFarland n. 1 utilizzando acqua sterile o soluzione fisiologica sterile allo 0,85%.
5. Diluire a  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ , mediante diluizioni seriali di 10 volte in acqua distillata sterile o soluzione fisiologica sterile allo 0,85%.
6. Proseguire con l'inoculo come indicato per il "test diretto".

#### D. Incubazione

Dopo l'inoculo, conservare le piastre al riparo dalla luce e disporle con il lato del terreno verso il basso, in una giara GasPak CO<sub>2</sub> o in un altro sistema adatto con atmosfera aerobica arricchita con circa 3 – 10 % di CO<sub>2</sub> e incubare a 35 – 37 °C.

In caso di perdita di umidità durante l'incubazione, mettere le piastre in buste di plastica (polietilene) permeabili alla CO<sub>2</sub>. Dopo aver espulso l'aria dalle buste, sigillarle utilizzando del nastro adesivo o un apparato termosigillante, oppure ripiegarne il bordo due o tre volte e fissare con punti metallici.

Impilare le piastre nelle buste, avendo cura di non mettere più di 6 piastre in ciascuna pila; per evitare l'accumulo di gocce di umidità nelle piastre di plastica durante l'incubazione, disporle su una superficie isolante, come polistirolo, vari strati di cartone, ecc. e non direttamente su un ripiano, vassoio o cestello di metallo.

Incubare le buste con le piastre a 35 – 37 °C in atmosfera aerobica arricchita con circa 3 – 10 % di CO<sub>2</sub>.

Dopo 5 – 7 giorni, è possibile esaminare i test di sensibilità ai farmaci con un microscopio per dissezione a bassa potenza e fornire un'indicazione preliminare dei risultati delle colture positive al momento dell'osservazione iniziale.<sup>7</sup> Il referto definitivo deve essere effettuato non prima di 3 settimane di incubazione, in quanto la crescita dei mutanti resistenti può essere più lenta sui terreni che contengono i farmaci che sui controlli.<sup>1,2</sup>

N.B. Per l'isolamento primario, le colture da lesioni cutanee sospette di contenere *M. marinum*, *M. ulcerans* o *M. haemophilum* devono essere incubate a una temperatura non superiore a 33 °C, mentre le colture sospette di contenere *M. avium* o *M. xenopi* evidenziano una crescita ottimale a 40 – 42 °C.<sup>1</sup> Incubare una un duplicato della coltura a 35 – 37 °C.

**Controllo di qualità a cura dell'utente** - Controllare le prestazioni del terreno senza farmaci inoculando colture pure di ceppi di controllo stabili di micobatteri che producono reazioni note e attese. Un ceppo farmacosensibile di *M. tuberculosis* è soddisfacente come controllo per dimostrare l'attività dei farmaci nei terreni utilizzati.<sup>2</sup>

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

#### RISULTATI<sup>1</sup> – Test diretto e indiretto

Un test viene considerato valido quando sono presenti 50 o più colonie su almeno uno dei controlli.

1. Registrare come segue la crescita batterica sui quadranti del terreno con i farmaci e su quello di controllo.

Confluenti (500 o più colonie)	4+
Quasi confluenti (200 - 500 colonie)	3+
100 - 200 colonie	2+
50 - 100 colonie	1+
Meno di 50 colonie	Conta effettiva delle colonie

2. Determinare la percentuale di bacilli resistenti utilizzando la formula seguente.

$$\frac{\text{Numero di colonie sul quadrante con il farmaco}}{\text{Numero di colonie sul quadrante di controllo}} \times 100 = \% \text{ di resistenza}$$

Calcolo esemplificativo

	Crescita		% di resistenza
	Non diluito	$10^{-2}$	
Controllo	4+	100	
INH 0,2 µg/mL	1+	10	10%
SM 2,0 µg/mL	0	0	0%
PAS 2,0 µg/mL	0	0	0%
	$\frac{10 \text{ colonie}}{100 \text{ colonie}} \times 100 = 10 \% \text{ di resistenza}$		

N.B. Le dimensioni delle colonie di microrganismi in crescita sui terreni contenenti farmaci possono essere considerevolmente inferiori rispetto a quelle in crescita sul controllo, specialmente con PAS (acido *p*-aminosalicilico); di conseguenza i risultati si basano sul numero e non sulle dimensioni delle colonie.

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Dato che la sensibilità farmacologica osservata è il risultato di un confronto tra la quantità di crescita rispettivamente sul terreno contenente il farmaco e sul controllo, occorre dimostrare l'uniformità dell'inoculo per ciascuna coltura. È indispensabile garantire l'uniformità della sospensione di inoculo e l'assenza di grossi grumi.
2. Dato che nella subcoltura in vitro la proporzione di batteri resistenti potrebbe subire delle modifiche, ogni volta che l'esame dello striscio rivela la presenza di bacilli acido-resistenti è preferibile eseguire il test diretto della sensibilità utilizzando come inoculo il campione.
3. Se si eseguono test indiretti di sensibilità da colture con colonie ben distinte, l'inoculo deve essere preparato da una selezione totalmente rappresentativa; tutti i tipi di colonie visibili devono essere campionati.

#### PRESTAZIONI DELLA METODICA

##### Dischi con etambutolo

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con etambutolo (EM-25 o EM-50) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per rilevare la concentrazione di etambutolo. I dischi con etambutolo (EM-25 o EM-50) vengono inseriti in provetta da centrifuga, insieme a 5 mL di acqua purificata, 2 mL di blu bromotimolo e 10 mL di benzene. Le provette vengono centrifugate per 5 min. Lo strato di benzene viene quindi trasferito in una cella da 1 cm e l'assorbanza viene letta su uno

spettrofotometro a raggi ultravioletti. L'assorbanza del campione per il test viene confrontata a quella di una soluzione di controllo contenente 5 mL di acqua purificata, 2 mL di blu bromotimolo e 10 mL di benzene. Viene quindi calcolata la potenza del disco.

#### Dischi con isoniazide

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con isoniazide (INH-1 o INH-5) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per rilevare la concentrazione di isoniazide. I dischi INH vengono inseriti in un matraccio graduato ed estratti a temperatura ambiente con 10 mL di acido cloridrico 0,01 N. Dopo 18 – 24 h vengono filtrati gli estratti. L'assorbanza di ciascun estratto filtrato viene determinata mediante spettrofotometria ultravioletta. La soluzione di riferimento utilizzata è HCl 0,01 N. La quantità di isoniazide presente nei dischi viene calcolata in base all'assorbanza di una soluzione standard di riferimento (entro il 10%) alla concentrazione desiderata.

#### Dischi con etionamide

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con etionamide (EA-25) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per rilevare la concentrazione di etionamide. I dischi EA vengono inseriti in un matraccio graduato ed estratti a temperatura ambiente con 10 mL di metanolo per 18 – 24 h. L'assorbanza di ciascun solvente estratto viene determinata mediante spettrofotometria ultravioletta. La soluzione di riferimento utilizzata è metanolo. La quantità di etionamide presente nei dischi viene calcolata in base all'assorbanza di una soluzione standard di riferimento (entro il 10%) alla concentrazione desiderata.

#### Dischi con streptomina

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con streptomina (S-50) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per determinare la concentrazione di streptomina mediante una procedura di dosaggio sviluppata dalla BD Diagnostics in base al protocollo per agenti antibiotici simili incluso nel *Code of Federal Regulations*, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs.

#### Dischi con rifampicina

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con rifampicina (RA-25) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per determinare la concentrazione di rifampicina mediante una procedura di dosaggio sviluppata dalla BD Diagnostics in base al protocollo per agenti antibiotici simili incluso nel *Code of Federal Regulations*, Part 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subpart A - Susceptibility Discs.

#### Dischi con acido *p*-aminosalicilico

Prima della spedizione, vengono testati tutti i lotti di dischi con acido *p*-aminosalicilico (PAS-10 o PAS-50) per verificare le caratteristiche specifiche del prodotto. Campioni rappresentativi del lotto vengono analizzati per rilevare la concentrazione di acido *p*-aminosalicilico. I dischi PAS vengono inseriti in un matraccio graduato ed estratti a temperatura ambiente con 10 mL di acido cloridrico 0,1 N (HCl). Dopo 18 – 24 h, l'assorbanza di ciascun estratto viene determinata mediante spettrofotometria ultravioletta. La soluzione di riferimento utilizzata è HCl 0,1 N. La quantità di acido *p*-aminosalicilico presente nei dischi viene calcolata in base all'assorbanza di una soluzione standard di riferimento (entro il 10%) alla concentrazione desiderata.

#### DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
231570	<b>BBL Sensi-Disc Streptomycin</b> , 50 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231571	<b>BBL Sensi-Disc Isoniazid</b> (Isonicotinyl hydrazine), 1 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231572	<b>BBL Sensi-Disc Isoniazid</b> (Isonicotinyl hydrazine), 5 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231573	<b>BBL Sensi-Disc P-Aminosalicylic Acid</b> , 10 µg, cartuccia singola da 50 dischi
231574	<b>BBL Sensi-Disc P-Aminosalicylic Acid</b> , 50 µg, cartuccia singola da 50 dischi
231575	<b>BBL Sensi-Disc Ethambutol</b> , 25 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231576	<b>BBL Sensi-Disc Ethambutol</b> , 50 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231577	<b>BBL Sensi-Disc Ethionamide</b> , 25 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€
231578	<b>BBL Sensi-Disc Rifampin</b> , 25 µg, cartuccia singola da 50 dischi C€

**BIBLIOGRAFIA** - Vedere la sezione "References" nel testo inglese.

## **BD Discos con antimicrobianos** **BBL Sensi-Disc** para uso en medios de cultivo

Español

Antimicrobianos	Código	Conc.
Estreptomina	*S-50	50 µg
Isoniazida (isonicotinil hidrazina)	INH-1	1 µg
	INH-5	5 µg
Ácido <i>P</i> -aminosalicílico	PAS-10	10 µg
	PAS-50	50 µg
Etambutol**	EM-25	25 µg
	EM-50	50 µg
Etionamida***	EA-25	25 µg
Rifampicina	*RA-25	25 µg

#### USO PREVISTO

Estos discos se utilizan en los procedimientos de análisis de sensibilidad cualitativa en medios de cultivo. Son un método cómodo para agregar agentes antimicrobianos a los medios de cultivo, especialmente en estudios cualitativos de micobacterias y organismos relacionados.

Para este procedimiento también se recomiendan determinados discos de prueba de sensibilidad: estreptomina 10 µg, kanamicina 30 µg y rifampicina 5 µg.<sup>1,2</sup>

Se agregan los discos a cantidades medidas de medio de agar licuado (por ej., agar Middlebrook and Cohn 7H10 o agar Seven H11) para preparar concentraciones recomendadas del agente antimicrobiano en agar solidificado.<sup>2</sup>

Con estos discos se pueden utilizar placas de Petri **X Plate** de cuatro compartimientos **Falcon**. Se pueden emplear tres secciones para diversos agentes o distintas concentraciones del mismo agente y la cuarta sección, como control sin antibiótico.

\* No debe utilizarse en pruebas convencionales de sensibilidad en disco (Bauer-Kirby o normalizadas).

\*\* Myambutol: Wyeth Laboratories

\*\*\* Trecator: Wyeth Laboratories

## RESUMEN Y EXPLICACION

Desde 1882, cuando Koch demostró que el bacilo tuberculoso era la causa de la tuberculosis, se han investigado diversos medios y métodos con el propósito de reducir el tiempo requerido para el aislamiento y las pruebas de sensibilidad farmacológicas.

Los bacilos acidorresistentes de muestras humanas revelados en el examen microscópico o en cultivo son por lo general *Mycobacterium tuberculosis*. No obstante, es posible encontrar otros organismos acidorresistentes patógenos y posiblemente no patógenos. Estas micobacterias "atípicas" o "no clasificadas" deben reconocerse y caracterizarse en el laboratorio porque el pronóstico y la respuesta al tratamiento farmacológico difieren mucho según la enfermedad causada por dichos organismos.

Este método de sensibilidad en disco por el que se utilizan discos en medios de cultivo ha demostrado ser una herramienta valiosa y fiable para muchos laboratorios.<sup>3-5</sup> Se trata de una técnica deseable debido a la sencilla preparación del medio de disco, la preparación cómoda y económica de cualquier cantidad de placas de prueba, la estabilidad de los antibióticos en los discos secos, la eliminación de posibles errores en la dilución y la medición de soluciones farmacológicas y el reconocimiento inmediato del antibiótico y la concentración presentes en cada medio gracias a los discos codificados. Se prepara sólo un medio. Los discos suministran los diferentes antibióticos y sus concentraciones.

## PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Estos discos se utilizan para impregnar todo el lecho de agar con una concentración específica de agente antimicrobiano. Dicho proceso se lleva a cabo fijando primero el disco en el centro del cuadrante de la placa y luego agregando una determinada cantidad de agar. Se coloca la placa en el refrigerador de un día para el otro con el fin de permitir la difusión en todo el medio. Luego, la placa se inocula con el organismo de prueba. Se producirá o no crecimiento, según el organismo sea resistente o sensible al agente antimicrobiano y la concentración empleada en el cuadrante. Dado que no se forman zonas, se utiliza el número de colonias o la ausencia de crecimiento en cada cuadrante para indicar sensibilidad al antibiótico.

## REACTIVOS

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

### Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra peligros microbiológicos en todos los procedimientos.<sup>1,6</sup> Realizar todas las manipulaciones en una cabina de seguridad biológica. Esterilizar los cultivos, recipientes y otros materiales contaminados después de su uso.

Se requiere la utilización de prácticas y procedimientos de seguridad biológica de nivel 2 y equipo e instalaciones para contención cuando se manipulen muestras clínicas sin producir aerosoles, como en la preparación de frotis acidorresistentes. Todas las actividades que generen aerosoles deben llevarse a cabo en un gabinete de seguridad biológica de clase I o II. Se requiere la utilización de prácticas de seguridad biológica de nivel 3 y equipo e instalaciones para contención en las actividades de laboratorio que incluyan la propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los estudios en animales también requieren la implementación de procedimientos especiales.<sup>6</sup>

### Instrucciones de almacenamiento:

1. Al recibir los envases con discos, se deben guardar a una temperatura entre -20 y +8 °C. Si el refrigerador del laboratorio se abre y cierra con frecuencia y no se mantiene una temperatura adecuada, guardar sólo la cantidad que se va a utilizar en una semana.
2. Permitir que los envases lleguen a temperatura ambiente antes de abrirlos. Devolver al refrigerador los discos que no hayan sido utilizados cuando se haya terminado la aplicación de los mismos.
3. Utilizar primero los discos cuya fecha de caducidad sea más próxima.

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

## RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS<sup>1,2</sup>

En el método de prueba directa de sensibilidad se pueden utilizar muestras digeridas y concentradas (por ej., esputo, lavado gástrico, orina, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial y de otra clase, exudados y tejidos), en los que se observan bacilos cuando se realizan frotis. Los cultivos de muestras pueden analizarse con el método indirecto.

## PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados:** En este paquete se suministran **Sensi-Disc** Antimicrobial Discs para uso en medios de cultivo, tal como se indica.

**Materiales necesarios pero no suministrados:**

1. Base de agar Middlebrook and Cohn 7H10 o base de agar Seven H11 y enriquecimiento Middlebrook OADC.
2. Baño María, aproximadamente a 45 °C.
3. Placas de cuatro compartimientos de 100 x 15 mm.
4. Dispensadores de una posición o pinzas.
5. Mechero de Bunsen conectado a gas.
6. Asa de inoculación con guía de platino o nicromo de calibre 24 a 26, colocado en un portasas con guía bacteriológica estándar. La guía forma un bucle "cerrado" de dos o tres milímetros de diámetro, con un eje de aproximadamente 6,35 cm de longitud.

7. Incubadora a 35 °C u otra temperatura adecuada.
  8. Pipeta **Cornwall** estéril de 10 mL o de otro tipo para el suministro de aproximadamente 5 mL de medio.
  9. Reactivos y equipo para tinciones acidorresistentes.
  10. Microscopios de baja potencia (o de disección) y de inmersión en aceite.
  11. Agua purificada estéril o solución salina al 0,85%, tubos con tapa roscada con un volumen de 4,5 mL.
  12. Pipetas de 1 mL y capilares Pasteur.
  13. Tubos de 16 x 125 mm con tapa roscada.
  14. Microesferas de vidrio o plástico, de 1 – 2 mm de diámetro o microesferas de plástico poliestireno para alta temperatura, tal como \*Styrone 700, 27 transparentes, N° 7.
  15. Caldo Middlebrook 7H9.
  16. Mezcladora de tubos de ensayo.
  17. Patrón N° 1 de MacFarland (preparado agregando 0,1 mL de BaCl<sub>2</sub> al 1% hasta 9,9 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%).
  18. Para incubación en una atmósfera aerobia enriquecida con CO<sub>2</sub>, se requiere un sistema **GasPak** con un sobre generador de dióxido de carbono desechable **GasPak**, un sistema **GasPak** ventilado, una incubadora de dióxido de carbono u otro sistema adecuado.
- \* Marca registrada de Dow Chemical Co.

#### Procedimiento del análisis:

##### A. Preparación de las placas

1. Preparar la cantidad necesaria de medio estéril completo. Debe ser líquido y a una temperatura aproximada de 50 °C.
2. Con dispensadores de un solo disco o pinzas estériles, colocar los discos en el centro de tres de los cuadrantes de la placa. El cuarto cuadrante sirve como control sin antibiótico.
3. Fijar los discos en los centros de los cuadrantes agregando una gota o dos del medio a cada uno. Si el medio se agrega con una aguja, como con una pipeta **Cornwall**, los discos pueden quedar fijos en su lugar mediante un reborde formado por el medio. La poca cantidad de agar se debe gelatinizar al instante.
4. Agregar el resto de los 5 mL del medio a cada cuadrante. La concentración resultante de agente antimicrobiano por mL de medio luego representará un quinto del contenido del disco.
5. Colocar las placas en el refrigerador de un día para el otro con el fin de permitir la difusión en todo el medio.
6. Inocular las placas tal como se describe a continuación.

##### B. Prueba de Sensibilidad de Antibiótico Directa<sup>1</sup>

La prueba de sensibilidad de antibiótico directa se realiza en una muestra en la que se puede demostrar la presencia de bacilos acidorresistentes (AFB) en un frotis de muestra digerida y concentrada.

1. Realice la tinción y efectúe la lectura del frotis de muestras clínicas concentradas. Registre el número promedio de bacilos acidorresistentes por campo con inmersión en aceite (deben observarse aproximadamente 20 campos positivos).
2. Seleccione las diluciones del digerido de muestra según los resultados de frotis positivos, de la manera siguiente:

Microscopia	Inocular
Menos de 1 AFB/campo	Sin diluir y en una dilución 10 <sup>-2</sup> (1:100)
1 - 10 AFB/campo	Dilución 10 <sup>-1</sup> y 10 <sup>-3</sup> (1:10 y 1:1.000)
Más de 10 AFB/campo	10 <sup>-2</sup> y 10 <sup>-4</sup> (1:100 y 1:10.000)

3. Realizar las diluciones indicadas con 0,5 mL del digerido de la muestra y 4,5 mL de agua estéril o solución salina. Mezcle y transfiera sucesivamente de 0,5 mL a 4,5 mL para realizar las diluciones necesarias.
4. Con una pipeta capilar, inocular 3 gotas en cada cuadrante del medio de antibiótico y de control. Se colocan dos diluciones de inóculos, cuya concentración por lo general difiere en 100 veces, en placas duplicadas de medio.

##### C. Prueba indirecta<sup>1</sup>

Siempre que sea posible, realice la prueba directa. La prueba indirecta utiliza como inóculo el crecimiento micobacteriano de un cultivo primario en un medio sólido o líquido sin antibiótico. Dicha prueba está indicada cuando:

1. El frotis da resultado negativo y se ha producido crecimiento en el cultivo primario.
2. El crecimiento en el control de la prueba directa es inadecuado para realizar un informe fiable.
3. Otro laboratorio envía un cultivo de referencia.

Para que la prueba sea válida, el inóculo debe ser lo suficientemente grande (50 – 100 colonias en el cuadrante de control) para obtener un buen crecimiento, pero no demasiado grande como para estimular resistencia al antibiótico, debido al crecimiento espontáneo de organismos mutantes resistentes al antibiótico.

1. Extraer aproximadamente de 2 a 5 mg de crecimiento del medio sin antibiótico. Si es posible, seleccionar una pequeña porción de cada colonia.
2. Transferir a un tubo estéril de 16 x 125 mm con tapa roscada con 6 a 8 microesferas de vidrio o plástico y 3 mL de medio líquido de polisorbato 80 y albúmina (caldo Middlebrook 7H9).
3. Homogeneizar las células en un mezclador de tubos de ensayo durante 5 a 10 min.
4. Permitir la decantación de las partículas grandes, retirar el sobrenadante y ajustar la densidad a aproximadamente un patrón N° 1 de MacFarland con agua estéril o solución salina estéril al 0,85%.
5. Diluir a una concentración entre 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup> mediante diluciones 1:10 seriadas en agua destilada estéril o solución salina al 0,85%.
6. Realizar la inoculación tal como se describe para la "prueba directa".

##### D. Incubación

Después de la inoculación, mantener las placas protegidas de la luz y colocarlas, con el medio hacia abajo, en una jarra de CO<sub>2</sub> **GasPak** u otro sistema adecuado que proporcione una atmósfera aerobia enriquecida con CO<sub>2</sub> al 3 – 10% aproximadamente e incubar a 35 – 37 °C.

Colocar las placas en bolsas de plástico (polietileno) permeables a CO<sub>2</sub> en los lugares que podrían perder humedad durante la incubación. Después de quitar el aire de las bolsas, sellarlas con cinta, un aparato de termosellado o doblar dos o tres veces y grapar.

Apilar no más de 6 placas en bolsas. Para evitar la acumulación de gotas de humedad en las placas durante la incubación, colocar placas de plástico en una superficie aislante (por

ej., espuma de poliestireno expandido o cartón de diversos grosores, etc.) y no directamente sobre un estante, bandeja o cesta de metal.

Incubar las bolsas de placas en una atmósfera aerobia enriquecida con CO<sub>2</sub> al 3 – 10% aproximadamente a 35 – 37 °C.

Las pruebas de sensibilidad directas pueden examinarse después de 5 a 7 días, con un microscopio de disección de baja potencia y es posible dar un informe preliminar de los hallazgos de los cultivos positivos en el momento de la observación inicial<sup>7</sup>. No se debe realizar un informe final hasta después de 3 semanas de incubación, porque el crecimiento de organismos mutantes puede ser más lento en los medios con antibiótico que en el control<sup>1,2</sup>.

NOTA: Los cultivos de lesiones cutáneas presuntivas de *M. marinum*, *M. ulcerans* o *M. haemophilum* deben incubarse a una temperatura no superior a 33 °C para el aislamiento primario; los cultivos presuntivos de *M. avium* o *M. xenopi* presentan crecimiento óptimo a 40 – 42 °C<sup>1</sup>. Incubar cultivos duplicados a 35 – 37 °C.

**Control de calidad del usuario:** Compruebe el rendimiento del medio sin antibiótico mediante la inoculación con cultivos puros de cepas de micobacterias estables de control que producen reacciones conocidas y deseadas. Una cepa de *M. tuberculosis* sensible a antibiótico es satisfactoria como control para demostrar la actividad de los antibióticos en los medios utilizados<sup>2</sup>.

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

## RESULTADOS<sup>1</sup> – Prueba directa y indirecta

La prueba se considera válida cuando se observan 50 colonias o más en al menos uno de los controles.

1. Registre el crecimiento bacteriano en el cuadrante de control y de medio con antibiótico, tal como se indica a continuación:

Confluyente (500 colonias o más)	4+
Casi confluyente (200 - 500 colonias)	3+
100 - 200 colonias	2+
50 - 100 colonias	1+
Menos de 50 colonias	Recuento real de colonias

2. Determinar el porcentaje de bacilos resistentes utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de colonias en el cuadrante con antibiótico}}{\text{Número de colonias en el cuadrante de control}} \times 100 = \% \text{ resistencia}$$

Cálculo de muestra	Crecimiento		% resistente
	Sin diluir	10 <sup>-2</sup>	
Control	4+	100	
INH 0,2 µg/mL	1+	10	10%
SM 2,0 µg/mL	0	0	0%
PAS 2,0 µg/mL	0	0	0%
	$\frac{10 \text{ colonias}}{100 \text{ colonias}} \times 100\% = 10\% \text{ resistencia}$		

NOTA: El tamaño de colonia de los organismos que crecen en medios con antibiótico puede ser marcadamente inferior al crecimiento en el medio de control, en especial con PAS. Por tanto, las lecturas se basan en la cantidad de colonias observadas y no en su tamaño.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Dado que la sensibilidad a antibiótico observada es una comparación del nivel de crecimiento en el medio de control y los medios con antibiótico, el inóculo para cada cultivo debe presentar una uniformidad demostrada. Es de suma importancia lograr una suspensión uniforme del inóculo y evitar la formación de grumos grandes.
2. Dado que se puede producir una modificación en la proporción de bacterias resistentes con el subcultivo *in vitro*, se prefiere realizar la prueba de sensibilidad directa utilizando la muestra procesada como inóculo siempre que el examen del frotis revele la presencia de bacilos acidorresistentes.
3. Si se realizan pruebas de sensibilidad indirectas de cultivos con colonias discretas, se debe preparar el inóculo a partir de una selección bien representativa; es necesario obtener muestras de todos los tipos de colonias.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Discos de etambutol

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de discos de etambutol (EM-25 o EM-50) se analizan para verificar las características del producto. Se analizan las muestras representativas del lote para determinar la concentración de etambutol. Se colocan discos de etambutol (EM-25 o EM-50) en tubos de centrifugado con 5 mL de agua procesada, 2 mL de azul de bromotimol y 10 mL de benceno. Se centrifugan los tubos durante 5 min. La capa de benceno luego se transfiere a una celda de 1 cm y se efectúa la lectura de absorbencia en un espectrofotómetro ultravioleta. La absorbencia de la muestra de prueba se compara con una solución de control formada por 5 mL de agua procesada, 2 mL de azul de bromotimol y 10 mL de benceno. Luego se calcula la potencia del disco.

### Discos de isoniazida

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de discos de isoniazida (INH-1 o INH-5) se analizan para verificar las características específicas del producto. Se analizan las muestras representativas del lote para determinar la concentración de isoniazida. Se colocan discos de INH en un matraz volumétrico y se obtienen extractos a temperatura ambiente con 10 mL de ácido hidrociorhídrico 0,01 N. Se filtran los extractos después de 18 a 24 h. Se determina la absorbencia de cada extracto filtrado mediante espectrofotometría ultravioleta. La solución de referencia es HCl 0,01 N. La cantidad de isoniazida presente en los discos se calcula según la absorbencia de una solución estándar de referencia (con un margen del 10%) de la concentración deseada.

### Discos de etionamida

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de discos de etionamida (EA-25) se analizan para determinar las características específicas del producto. Se analizan las muestras representativas del lote para determinar la concentración de etionamida. Los discos de etionamida se colocan en un matraz volumétrico y se obtienen extractos a temperatura ambiente con 10 mL de metanol durante 18 a 24 h. Se determina la absorbencia de cada solvente de extracto mediante espectrofotometría ultravioleta. Se utiliza metanol como solución de refe-

rencia. La cantidad de etionamida presente en los discos se calcula según la absorbencia de una solución estándar de referencia (con un margen del 10%) de la concentración deseada.

#### **Discos de estreptomina**

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de discos de estreptomina (S-50) se analizan para determinar las características específicas del producto. Se analizan muestras representativas del lote para determinar la concentración de estreptomina mediante un procedimiento analítico desarrollado por BD Diagnostics que se basa en el protocolo para agentes antimicrobianos similares en el *Code of Federal Regulations*, Parte 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subparte A - Susceptibility Discs.

#### **Discos de rifampicina**

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de discos de rifampicina (RA-25) se analizan para determinar las características específicas del producto. Se analizan muestras representativas del lote para determinar la concentración de rifampicina mediante un procedimiento analítico desarrollado por BD Diagnostics que se basa en el protocolo para agentes antimicrobianos similares en el *Code of Federal Regulations*, Parte 460- Antibiotic Drugs Intended for Use in Laboratory Diagnosis, Subparte A - Susceptibility Discs.

#### **Discos de ácido P-aminosalicílico**

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los discos de ácido P-aminosalicílico (PAS-10 o PAS-50) se analizan para verificar las características específicas del producto. Se analizan las muestras representativas del lote para determinar la concentración de ácido P-aminosalicílico. Se colocan discos de PAS en un matraz volumétrico y se obtienen extractos a temperatura ambiente con 10 mL de ácido hidrociorhídrico (HCl) 0,1 N. La absorbencia de cada extracto se determina mediante espectrofotometría después de 18 a 24 h. La solución de referencia es HCl 0,1 N. La cantidad de ácido P-aminosalicílico presente en los discos se calcula según la absorbencia de una solución estándar de referencia (con un margen del 10%) de la concentración deseada.

#### **DISPONIBILIDAD**

<b>Nº de cat.</b>	<b>Descripción</b>
231570	<b>BBL Sensi-Disc Streptomycin</b> , 50 µg, cartucho único de 50 discos €€
231571	<b>BBL Sensi-Disc Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine)</b> , 1 µg, cartucho único de 50 discos €€
231572	<b>BBL Sensi-Disc Isoniazid (Isonicotinyl hydrazine)</b> , 5 µg, cartucho único de 50 discos €€
231573	<b>BBL Sensi-Disc P-Aminosalicylic Acid</b> , 10 µg, cartucho único de 50 discos
231574	<b>BBL Sensi-Disc P-Aminosalicylic Acid</b> , 50 µg, cartucho único de 50 discos
231575	<b>BBL Sensi-Disc Ethambutol</b> , 25 µg, cartucho único de 50 discos €€
231576	<b>BBL Sensi-Disc Ethambutol</b> , 50 µg, cartucho único de 50 discos €€
231577	<b>BBL Sensi-Disc Ethionamide</b> , 25 µg, cartucho único de 50 discos €€
231578	<b>BBL Sensi-Disc Rifampin</b> , 25 µg, cartucho único de 50 discos €€

**REFERENCIAS:** Véase la sección "References" en el texto inglés.



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



Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použít do / Usar antes de / Använd före / Използвайте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Uprotebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutning af 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 = mensesio pabaiga) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutten av måneden) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) / AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = sluttet på månaden) / ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = края на месеца) / AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) / YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) / GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) / ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = конец месяца) / ЖӨЖӨК-АА-КК / ЖӨЖӨК-АА (АА = айдың соңы) / GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)



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



EC/REP Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret 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 / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Автура Топлuluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығыныңдағы уәкелетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU



IVD In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai 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 Diagnostic Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperatuurlimiet / Temperatuuri piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hörmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje toploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



LOT 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 / Inneholder 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 / Достаточно для <n> тестов(а) / <n> тесттері үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova



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



 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
800-638-8663  
[www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds)

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