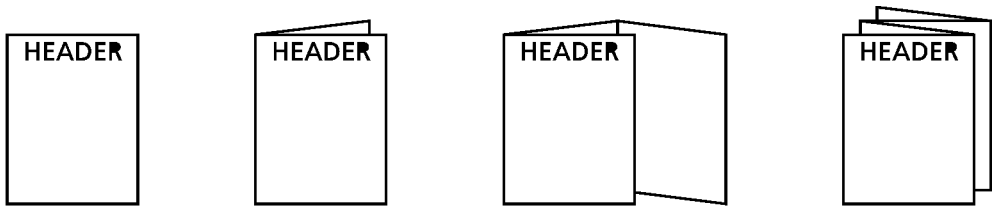
Revisions

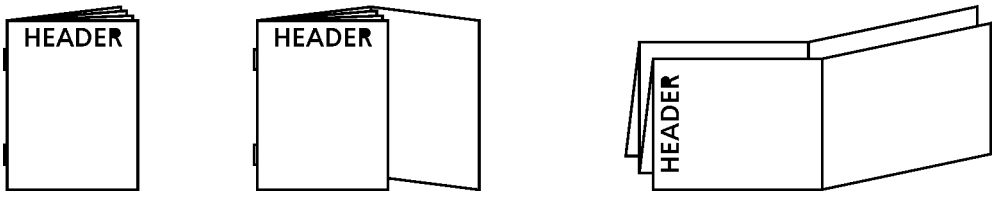
Rev from	Rev to	ECO #
0607	**2010/06**	**5378-10**

Notes:

1. BD Cat. Number 442102
2. Blank (Sheet) Size : Length: N/A Width: N/A
   Number of Pages: N/A Number of Sheets: N/A
   Page Size: Length N/A Width N/A Final Folded Size: N/A
3. Style (see illustrations below): N/A



#1 #2 #3 #4



#5 #6 #7

4. See Specification Control Number VS-0250 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides [X] Yes [ ] No
   No. of Colors: 1 PMS# 199 Red
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design Date Proofer Date Checked By Date Part Number: PP118JAA	COMPANY CONFIDENTAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
	Category and Description Package Insert, BACTEC SIRE Drug Kit	Sheet: 1 of 31 Scale: 1:1	A

BD BACTEC™ S.I.R.E. Drug Kit

English:	pages	1 – 5	Italiano:	pagine	14 – 18
Français :	pages	5 – 9	Português:	páginas	18 – 22
Deutsch:	Seiten	10 – 14	Español:	páginas	23 – 27

PP118JAA
2010/06

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

INTENDED USE

BACTEC™ S.I.R.E. Drug Kit contains antimicrobials for use with **BACTEC** 12B Medium in the testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Principal use is with the **BACTEC** 460TB instrument.

BACTEC S.I.R.E. Drugs (Streptomycin, Isoniazid, Rifampin and Ethambutol) are recommended as additives to **BACTEC** 12B Culture Medium for the qualitative susceptibility testing of *M. tuberculosis* from culture.

SUMMARY AND EXPLANATION

The **BACTEC** procedure for drug susceptibility testing of mycobacteria is based on the same basic principle employed in the conventional method except that a liquid medium is used and instead of counting colonies after about 3 weeks, the growth is monitored radiometrically and the results are reportable within 4 to 12 days. **BACTEC** drug susceptibility is determined by following a modified version of the conventional proportion method.[1] The critical proportion for resistance is taken as 1% for all antituberculosis drugs. This means that if 1% or more of the test mycobacterial population is resistant, the culture is considered resistant for laboratory reporting purposes. Resistance is determined by comparing the rate of growth in the control vial and the 12B Medium vials containing the test drug.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The basic principle of the **BACTEC** radiometric susceptibility assay for mycobacteria is similar to the one utilized in the primary isolation procedure. When mycobacteria grow in 7H12 medium containing ^{14}C-labeled substrate, they utilize the substrate and $^{14}CO_2$ is produced. The amount of $^{14}CO_2$ detected reflects the rate and amount of growth occurring in the vial, and is expressed in terms of the "Growth Index" (GI). When an antituberculous drug is added to the medium, suppression of growth occurs if the test organisms are susceptible. This suppression can be detected by either a decline or a very small increase of the daily GI as compared to the control. However, if the organisms are resistant, little or no suppression occurs.

To determine the 1% proportion of resistance, the bacterial inoculum used in the control vial is one-hundred fold less than that used for the drug-containing vial. The drug and control vials are tested daily after inoculation. The rate of increase in the GI, or the amount of change over that of the previous day, called delta (Δ) GI, is compared between the control vial and the vials containing drugs. If the daily GI increase in the drug vial is equal to or greater than that in the control vial, the test organisms are considered resistant to the drug. For a susceptible population, the daily GI increase for the control would be higher than that of the drug vial. For example, if 1% of the mycobacterial population is resistant to isoniazid (INH), then 99% of the organisms would be inhibited by INH and only 1% will grow in the drug vial. The growth rate in the drug vial would be similar to the growth rate in the control vial in which the original bacterial inoculum was only 1/100 of that in the drug vial.

REAGENTS

The **BACTEC** S.I.R.E. Drug vials contain the following active ingredients prior to processing:

Lyophilized antimicrobials, each vial:

Streptomycin	1.2 mg
Isoniazid	0.02 mg
Rifampin	0.4 mg
Ethambutol	1.5 mg

Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

This product contains dry natural rubber.

Pathogenic microorganisms, including hepatitis virus and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"[2-5] and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood or other body fluids.

Prior to use, each vial should be examined for evidence of damage, deterioration or contamination. DO NOT USE any vial showing evidence of contamination. Vials that exhibit evidence of damage should be discarded. On rare occasions, the glass bottle may be cracked and the neck may break during removal of the flip-off cap or in handling.

Before sampling positive 12B Medium culture vials for subculturing or staining, etc., it is necessary to release gas which may build up due to microbial metabolism. Aseptic techniques and established precautions against microbial hazards should be used at all times. Procedures should be performed in a suitable biological safety cabinet in a room with an appropriate ventilation system as recommended by the CDC.[6] Use a proper protective gown, mask, and gloves while handling specimens and cultures of potential pathogens. Follow the CDC and OSHA recommendations.

To minimize the potential of leakage during inoculation, use syringes with permanently attached needles or securely fastened **Luer-Lok**™ brand tips.

Drug concentrations used in the conventional susceptibility testing may vary from laboratory to laboratory. It is very important to select an equivalent concentration of a test drug for the **BACTEC** susceptibility testing if the results obtained by the two methods are to be compared.

Addition of the accurate amount of a test drug into the culture medium is a critical step in the susceptibility testing.

Storage Instructions

BACTEC S.I.R.E. Drug vials should be stored in a cool (2 – 8°C), dry place out of direct sunlight. Once reconstituted, they can be stored for not more than 3 days at 2 – 8°C or frozen at -20°C or colder for up to six months. Freeze in small aliquots. Do not freeze and thaw repeatedly. The expiration date applies to the unopened lyophilized bottle when stored as recommended.

SPECIMEN COLLECTION

Isolated pure actively growing cultures are used for susceptibility testing. For details see the 12B Medium Package Insert (PP116JAA) and the **BACTEC** 460TB System Product and Procedure Manual (MA-0029).

PROCEDURE

Material Provided: BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Materials Required But Not Provided: BACTEC 12B Medium, **BACTEC** 460TB Instrument, **BACTEC** Diluting Fluid, 5 mL syringe, distilled / deionized water, tuberculin syringe with permanently attached needle, disinfectant solution, 70% isopropyl alcohol.

Test Procedure

BACTEC S.I.R.E. Drugs (Streptomycin, Isoniazid, Rifampin and Ethambutol) are provided in lyophilized form. The standard procedure and drug concentrations should be followed. The concentration of drugs after reconstituting with 5 mL of sterile distilled/deionized water and after dilution (as appropriate) are as follows:

Drug	Reconstituted	Dilution Factor	Concentration/mL	Qty. added to 12B Medium	Final Concentration in 12B Medium/mL
Streptomycin	5 mL	———	240 µg	0.1 mL	6.0 µg
Streptomycin	5 mL	1:3 dilution	80 µg	0.1 mL	2.0 µg*
Isoniazid	5 mL	———	4 µg	0.1 mL	0.1 µg*
Rifampin	5 mL	———	80 µg	0.1 mL	2.0 µg*
Ethambutol	5 mL	———	300 µg	0.1 mL	7.5 µg
Ethambutol	5 mL	1:3 dilution	100 µg	0.1 mL	2.5 µg*

*Equivalent to the critical concentrations recommended by CDC.

Examples of conventional media equivalent concentrations for primary and secondary drugs are found in the **BACTEC** 460TB Product and Procedure Manual in Section IV.

If dilution is required to achieve the desired drug concentration (see above), aseptically dilute in sterile distilled/deionized water. Shake well.

Preparation of Drug Medium: Use a freshly prepared drug solution or thaw a tube of frozen stock drug solution. Using a 1 mL single-use syringe, add exactly 0.1 mL into a 4 mL **BACTEC** 12B Medium vial. Use a separate syringe for each drug. Care should be taken not to have any air bubbles in the syringe, and the last 0.1 mL portion in the syringe should not be used. All of the 12B Medium vials used in the test should be pre-tested on a **BACTEC** 460TB instrument to establish a CO_2 atmosphere in the vial and to screen out any vials with a GI of 20 or more.

Preparation of Bacterial Inoculum: Actively growing *M. tuberculosis* cultures in 12B Medium or on solid media are used for setting up susceptibility testing.

When a **BACTEC** 12B vial reads ≥ 10, reincubate and test daily. Refer to the following chart as to when to set up the susceptibility test.

DAILY READING	ACTION
GI 300 – 499	Incubate one additional day and then set up test.
GI 500 – 799	Set up test same day.
GI ≥ 800	Dilute 1:2 with 1 mL diluting fluid; set up test.

If susceptibility testing is to be delayed, refrigerate 12B vial. At this point susceptibility test must be set up within one week.

Prepare a uniform bacterial inoculum by alternately pulling the medium into a single-use syringe with a permanently attached needle, and pushing it back into the vial several times without removing the needle from the septum of the vial. This inoculum is used directly for the drug susceptibility test.

Solid Medium Culture: Make a homogenized suspension of several colonies on solid medium. The culture should not be more than 4 – 5 weeks old. Adjust the suspension to McFarland No. 1.0 if using the daily schedule and 0.5 for the non-weekend schedule. If viability or age of the culture is uncertain, subculture into a 12B Medium to obtain fresh growth.

Inoculation: Arrange the 12B Medium vials in a rack and label them properly (usually control, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, Ethambutol). You will need one vial for each drug concentration and one for the control. (The cardboard shipment trays may be used as racks.)

Wearing rubber gloves and working in a biological safety cabinet, inoculate 0.1 mL of the bacterial suspension into each of the **BACTEC** 12B Medium vials containing a drug. Use a disposable tuberculin syringe with a permanently attached needle for this inoculation.

For the control vial, do not inoculate the suspension directly but first dilute 1:100 by transferring 0.1 mL of the suspension into 9.9 mL of special Diluting Fluid. After mixing thoroughly, inverting at least 10 times, inoculate 0.1 mL of this dilution into the control 12B Medium vial (without a drug).

Swab the top of each inoculated vial with a gauze pad soaked with an appropriate disinfectant, followed by cleaning with a 70% alcohol swab. Incubate at 37°C ± 1°C.

Reading Schedule:

Daily Testing Schedule: Test the vials daily (including weekends and holidays) at approximately the same time each day (± 2 h) on a **BACTEC** 460TB until a GI of 30 or more is achieved in the control vial. Test for a minimum of 4 days or a maximum of 12 days. Using this testing schedule, a drug susceptibility test can be set up on any day of the week.

Non-Weekend Schedule: The procedure is similar to the daily testing schedule discussed above with the following exceptions:[7] (a) Batch all positive cultures and set up susceptibility tests on Friday only. Follow the procedures described earlier. (b) If a positive **BACTEC** vial is used, see chart above.

Start testing inoculated vials on Monday, skipping the weekend. The vials should be tested at least on Monday, Tuesday and Wednesday (minimum of 5 days from the inoculation day to a maximum of 12 days) approximately at the same time each day (± 2 h).

Direct Drug Susceptibility Test: If a specimen is positive for AFB on a smear, it usually contains enough mycobacteria to perform a drug susceptibility test in 12B Medium. The procedure is basically the same as in indirect susceptibility. The procedure differences are as follows:

After specimen processing, inoculate the culture media and make a smear for AFB staining. Refrigerate the remainder of the specimen concentrate.

Examine the AFB smear. If it is positive with the Ziehl-Neelsen or fluorochrome method, set up the susceptibility test the same day.

Add **BACTEC PANTA** to all of the drug-containing and drug-free (control) vials. Add 0.1 mL of well-mixed specimen concentrate into the drug-containing vials. Dilute the specimen concentrate 1:10 and inoculate 0.1 mL into the control vial. Incubate at 37°C and test the vials on the **BACTEC** 460TB System instrument every 2 to 3 days for a maximum of 21 days. With highly smear-positive specimens, test daily.

Interpret the results when the GI of the control is 20 or more. Confirm the results with an indirect susceptibility test. Report the results once the identification of *M. tuberculosis* is confirmed by a **BACTEC** NAP test or other tests.

Quality Control

DO NOT USE vials past their expiration date.

DO NOT USE vials that exhibit any cracks or defects; discard the vial in an appropriate manner.

Quality Control Certificates are provided with each S.I.R.E. Drug Kit. Quality Control Certificates show test organisms utilized for this type of product.

The user should examine all vials for evidence of deterioration prior to use. Vials displaying turbidity, contamination, or discoloration (darkening) should not be used. S.I.R.E. Drug vials displaying moisture (absence of fluffy appearance) should not be used. The performance of the drugs may be checked by susceptibility testing one or more quality control organisms with each susceptibility test set up.

ATCC™ No.	Strain
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv Susceptible to S.I.R.E. Drugs
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv Streptomycin resistant
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv Isoniazid resistant
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv Ethambutol resistant
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv Rifampin resistant

ATCC 27294 H37Rv should always be included and should always be susceptible. If this culture shows resistance to any drug or if the control of the susceptibility test of any culture fails to grow (within 12 days) do not report the results. Repeat the test.

As part of the daily maintenance schedule, Performance Test Vials (**BACTEC** Performance Test Kit) should be tested on the **BACTEC** instrument. If low readings are obtained, yet Performance Test Vials were tested properly, possible instrument problems may be indicated (see the **BACTEC** PTK package insert, PP046JAA).

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 CLSI (formerly NCCLS) guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

INTERPRETATION OF RESULTS

When the control vials reach a GI of 30 or more, the results should be interpreted as follows: if the ΔGI is less in the drug vial than the control, the population is susceptible; if more, it is resistant.

ΔGI (Control) > ΔGI (drug) – "susceptible"

ΔGI (Control) < ΔGI (drug) – "resistant"

ΔGI (Control) ≈ ΔGI (drug) – "borderline"

The following table represents data obtained from *M. tuberculosis* grown on solid medium and tested using the **BACTEC** susceptibility method. Similar data is obtained from *M. tuberculosis* initially grown in a 12B Medium. However, because of fewer cells in the inoculum, initial readings may be lower.

	Daily GI Reading				
Day	Control	Streptomycin	Isoniazid	Rifampin	Ethambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
ΔGI	+41	+2	+250	+2	-9
Results	—	Susceptible	Resistant	Susceptible	Susceptible

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Variations in preparation of inoculum affect the outcome of susceptibility test results, especially the presence of large clumps and improper 1:100 dilution for the control vial. If growth in the control vial is unsatisfactory, the test should be repeated.

Contamination

Care must be taken to prevent contamination during inoculation into the **BACTEC** 12B vial. A contaminated sample will give a positive reading but will not indicate a relevant clinical sample. Such a determination must be made by the user based on such factors as type of organism recovered, occurrence of the same organism in multiple cultures, patient history, appropriate equipment checks, etc. Contamination may also result from improper maintenance of **BACTEC** needles and tubing, poor septum cleansing or malfunction of the **BACTEC** needle heating unit (see TB Hood Operation and Maintenance Manual).

Due to the nature of biological materials in media products and inherent organism variability, the user shall be cognizant of potential variable results in the recovery of certain organisms.

EXPECTED VALUES

With Rifampin, Streptomycin and Isoniazid, there is usually a sharp decrease in the GI within a few days if the population is susceptible. With Ethambutol, there is usually a small initial increase in the GI before the GI values start to decline. The rate of GI decrease depends on the speed of action of the drug and the susceptibility of the bacteria. If a culture of *M. tuberculosis* has a mixed population of susceptible and resistant organisms, the ΔGI values versus time would vary depending on the percentage of the population that is susceptible.

For the direct susceptibility test, the overall success and the required time to report is dependent on the smear positivity. An average of 10 – 12 days with good agreement with the conventional test results has been reported in literature.[8,9]

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Several published studies have reported that results obtained by the **BACTEC** susceptibility method compared well with the conventional proportion method (employing 7H10/7H11 media) or the resistance ratio method (employing Lowenstein-Jensen egg medium).[1,10-15] The accuracy and reproducibility of the **BACTEC** susceptibility method has also been evaluated, with results often achieved within 4 – 6 days.[16-20]

A study by Huang et al. comparing the **BACTEC** 460TB System with the method of proportions gave the following results:[21]

Table 1. Antimicrobial susceptibility test results and diagnostic performance indices as determined by the BACTEC 460TB system, compared to the agar dilution method, based on 47 isolates of *M. tuberculosis*.

Drug, method, & drug concentration*	No. of isolates with specified results†				Diagnostic performance indices	
	Both S	Both R	Agar S **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** S	Specificity (%)	Sensitivity (%)
STR						
BACTEC 2.0 µg/mL	36	9	0	2	100	81.8
INH						
BACTEC 0.1 µg/mL	16	29	1	1	94.1	96.7
RMP						
BACTEC 2.0 µg/mL	30	14	1	2	96.8	87.5
EMB						
BACTEC 2.0 µg/mL	35	2	4	6	89.7	25

*In the agar dilution method, the drugs were tested at the following concentrations: STR, 2 µg/mL; INH, 0.2 µg/mL; RMP, 1.0 µg/mL; and EMB, 5 µg/mL.

†S = susceptible; R = resistant.

A study by Bemer et al. compared the **BACTEC** 460TB S.I.R.E. system with **BACTEC MGIT** 960 S.I.R.E. system. One hundred and ten strains were tested with an overall agreement of 93.5%. The turnaround times were between 4.0 to 10.0 days of the **BACTEC** 460TB S.I.R.E., with a median of 7.0 days.[22]

Table 2. Drug susceptibility results of clinical strains of *M. tuberculosis* as determined by BACTEC MGIT 960 AND BACTEC 460TB system.†

Drug (concn in µg/mL)	No. of tests	No. of results that were:				Agreement (%)
		S by both tests	R by **MGIT** 960; S by 460TB	S by **MGIT** 960; R by 460TB	R by both tests	
INH (0.1)	110	81	4		25	96.4
INH (0.4)	29	5	3		21	89.7
RIF (2.0)	110	92	1		17	99.1
EMB (2.5)	110	93	3	1	13	96.4
EMB (7.5)	17	7	3		7	82.4
STR (2.0)	110	76	9		25	91.8
STR (6.0)	34	12	10		12	70.6
Total of tests	520	366	33	1	120	93.5

†S, susceptible; R, resistant.

A study by Bergmann and Woods compared the **BACTEC** 460TB S.I.R.E. drugs ethambutol and streptomycin with the method of proportions. The results are demonstrated in the table below:[23]

Table 3. Initial ethambutol and streptomycin susceptibility test results by BACTEC, and the method of proportion.†

Drug	No. of results that were:		No. of isolates
	BACTEC system	MOP	
Ethambutol	S	S	63
	R	R	8
	S	R	3
Streptomycin	S	S	59
	R	R	14
	R	S	1

†Abbreviations: MOP, method of proportions; S, susceptible; R, resistant.

In a separate study, Bergmann and Woods also looked at the **BACTEC** 460TB S.I.R.E. drugs isoniazid and streptomycin and compared them with the method of proportions:[24]

Table 4. Resolved susceptibility test results for clinical isolates of *M. tuberculosis* by method of proportion, BACTEC 460TB.

Drug and result	No. of isolates with results by[a]:	
	MOP	**BACTEC** 460TB
Isoniazid (low[b])		
Susceptible	16	16
Resistant	4	4
Isoniazid (high[c])		
Susceptible	19	18
Resistant	1	2
Rifampin		
Susceptible	17	17
Resistant	3	3

[a]MOP, method of proportions.

[b]Low, 0.2 µg/mL for method of proportion and 0.1 µg/mL for **BACTEC** 460TB.

[c]High, 1.0 µg/mL for method of proportion and 0.4 µg/mL for **BACTEC** 460TB.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 vials lyophilized Streptomycin, 2 vials lyophilized Isoniazid, 2 vials lyophilized Rifampin, 2 vials lyophilized Ethambutol.
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 vial lyophilized Isoniazid.
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 per carton.

REFERENCES:

1. Canetti, G. et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug susceptibility, and the use of sensitivity test in tuberculosis programmes. Bull. W.H.O. 1969, *41*:21-43.
2. National Commitee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, PA.
3. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
4. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC) 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
6. Kent, P.T. et al. Public health mycobacteriology, a guide for the level III laboratory. Centers for Disease Control, Division of Laboratory Training and Consultation. Atlanta, GA, 1985.
7. Hawkins, J.E. Non-weekend schedule for **BACTEC** susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. *23*:934-937, 1986.
8. Libonati, J.P. et al. Identification and direct drug susceptibility testing of mycobacteria by the radiometric method. Abstract C300, A.S.M. Annual Meeting, St. Louis, MO, 1984.
9. Stager, C.E. et al. Identification and susceptibility testing of *M. tuberculosis* by direct inoculation of smear-positive specimens into **BACTEC** 12A media. Abstract, C301, A.S.M. Annual Meeting, St. Louis, MO, 1984.
10. Bannister, E.R. et al. Comparison of detection, identification and drug susceptibility testing of mycobacteria by using the **BACTEC** radiometric method and conventional methods. Abstract C260, A.S.M. Annual Meeting, Las Vegas, 1985.
11. Roberts, G.D. et al. Evaluation of **BACTEC** radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J. Clin. Microbiol. *18*:689-696, 1983.
12. Siddiqi, S.H. et al. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1981, *13*:908-912.
13. Siddiqi, S.H. et al. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. J. Clin. Microbiol. 1985, *22*:919-923.
14. Vincke, G. et al. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric technique. J. Antimicrobiol. Chemother. 1982, *10*:351- 354.
15. Snider, Jr., D.E. et al. Rapid drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Am. Rev. Respir. Dis. *123*:402-406, 1981.
16. Good, R.C. et al. Reproducibility of drug susceptibility tests with *M. tuberculosis*. Abstract U5, A.S.M. Annual Meeting, St. Louis, MO, 1984.
17. Siddiqi, S.H. et al. Accuracy and reproducibility of the **BACTEC** drug susceptibility testing of *M. tuberculosis*. Abstract 1041, I.C.A.A.C. Annual Meeting, Las Vegas, NV, 1983.
18. Terrand, J.J. et al. Evaluation of the **BACTEC** radiometric method for detection of 1% resistant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1985, *21*:941-946.
19. Woodley, C.L. Evaluation of streptomycin and ethambutol concentrations for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and conventional procedures. J. Clin. Microbiol. 1986, *23*:385-386.
20. Heifets, L.B. "Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infection." C.R.C. Press, Inc., Boca Raton, FL, 1991.
21. Huang, T., H. Tu, S. Lee, W. Huang and Y. Liu. 2002 Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs: comparisons of the **MGIT** 960 and **BACTEC** 460 systems. Ann. Clini. Lab. Sci. *32*:142-147.
22. Bemer, P., F., Palicova, S., Rüsch-Gerdes, H., Drugeon, and G., Pfyffer, 2002. Multicenter evaluation of fully automated **BACTEC** Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 System for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. *40*:150-154.
23. Bergmann, J.S., and G.L. Woods. 1997. Reliability of mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. J. Clin. Microbiol. *35*:3325-3327.
24. Bergmann, J.S., and G.L. Woods. 1998. Evaluation of the ESP culture system II for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four primary antituberculosis drugs. J. Clin. Microbiol. *36*:2940-2943.

BD BACTEC S.I.R.E. Drug Kit

Français

APPLICATION

La **BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit (trousse d'antibiotiques **BACTEC** S.I.R.E.) contient des agents antimicrobiens servant conjointement avec le **BACTEC** 12B Medium (milieu **BACTEC** 12B) à réaliser les tests de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce milieu s'utilise principalement avec le **BACTEC** 460TB Instrument (système **BACTEC** 460TB).

Les **BACTEC** S.I.R.E. Drugs (antibiotiques **BACTEC** S.I.R.E. : streptomycine, isoniazide, rifampicine et éthambutol) sont recommandés comme additifs au **BACTEC** 12B Culture Medium (milieu de culture **BACTEC** 12B) pour réaliser des tests de sensibilité qualitatifs de *Mycobacterium tuberculosis* en culture.

RESUME ET EXPLICATION

La méthode **BACTEC** de test de sensibilité des mycobactéries aux antibiotiques reprend le principe de base employé pour l'antibiogramme conventionnel, mais s'effectue en phase liquide. Dans ce milieu, le suivi de la croissance bactérienne par radiométrie remplace l'énumération des colonies après environ 3 semaines, et les résultats peuvent être rapportés dès 4 à 12 jours. Dans la méthode **BACTEC**, la sensibilité aux antibiotiques est déterminée selon une version modifiée de la méthode des proportions traditionnelle.[1] La proportion critique de résistance est de 1 % pour tous les antituberculeux, ce qui signifie que si 1 % au moins de la population de mycobactéries testée est résistante, la culture est considérée comme résistante et rapportée comme telle par le laboratoire. La résistance est déterminée en comparant le taux de croissance du flacon de contrôle et des flacons de 12B Medium contenant l'antibiotique à tester.

PRINCIPES DE LA METHODE

Le principe de base du test radiométrique **BACTEC** de sensibilité des mycobactéries est similaire à celui utilisé dans la méthode d'isolement primaire. Les mycobactéries cultivées en milieu 7H12 métabolisent le substrat marqué au ^{14}C et produisent du $^{14}CO_2$. La quantité de $^{14}CO_2$ dégagée est proportionnelle au taux de croissance dans le milieu, exprimé en « indice de croissance » (IC). Lorsqu'un antituberculeux est ajouté au milieu, la croissance est inhibée si les microorganismes à tester sont sensibles à cet antituberculeux. Cette inhibition se traduit par une diminution ou une très faible augmentation de l'IC quotidien comparativement au contrôle. Cependant, si les microorganismes sont résistants, la croissance bactérienne est peu inhibée, voire pas du tout.

Pour déterminer la proportion de résistance de 1 %, l'inoculum bactérien destiné au flacon de contrôle est 100 fois moins concentré que celui utilisé dans le flacon contenant l'antibiotique. Les flacons d'antibiotique et de contrôle ensemencés sont analysés quotidiennement. Le taux d'accroissement de l'IC, ou variation par rapport au jour précédent appelée delta (Δ) IC, est comparé entre le flacon de contrôle et les flacons contenant les antibiotiques. Si l'augmentation de l'IC quotidien dans le flacon contenant l'antibiotique est supérieure ou égale à celle du flacon de contrôle, les microorganismes à tester sont considérés comme résistants à l'antibiotique. Dans le cas d'une population sensible, l'augmentation de l'IC quotidien du flacon de contrôle serait supérieure à celle du flacon contenant l'antibiotique. Par exemple, si 1 % de la population mycobactérienne est résistante à l'isoniazide (INH), alors 99 % des microorganismes seront inhibés par l'INH et seul 1 % se développera dans le flacon contenant l'antibiotique. Le taux de croissance dans le flacon contenant l'antibiotique serait similaire à celui du flacon de contrôle dans lequel l'inoculum bactérien d'origine est 100 fois moins concentré que dans le flacon contenant l'antibiotique.

REACTIFS

Avant traitement, les flacons d'antibiotiques **BACTEC** S.I.R.E. contiennent les réactifs suivants :

Agents antimicrobiens lyophilisés (par flacon):

Streptomycine .....1,2 mg
Isoniazide .....0,02 mg
Rifampicine .....0,4 mg
Ethambutol .....1,5 mg

Avertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »[2-5] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Avant l'emploi, inspecter les flacons et s'assurer qu'ils ne sont pas endommagés, détériorés ou contaminés. NE PAS UTILISER les flacons présentant des signes de contamination. Jeter les flacons visiblement endommagés. Il peut arriver que le goulot d'un flacon en verre soit fêlé et se rompe lors du retrait de la capsule de protection ou pendant les manipulations.

Avant d'effectuer un prélèvement dans les flacons de 12B Medium positifs en vue d'un repiquage ou d'une coloration, il est nécessaire de libérer tout gaz accumulé résultant du métabolisme bactérien. Respecter les techniques d'asepsie et prendre les précautions en vigueur contre les dangers microbiologiques. Effectuer les manipulations sous une hotte biologique de sécurité dans un local équipé d'une ventilation adéquate conformément aux recommandations du CDC (*U.S. Centers for Disease Control and Prevention*).[6] Porter une blouse protectrice adéquate, un masque et des gants pour manipuler des échantillons et des cultures potentiellement pathogènes. Suivre les recommandations des CDC et de l'OSHA (*U.S. Occupational Safety and Health Administration*).

Pour minimiser le risque de fuite pendant l'ensemencement, utiliser des seringues munies d'aiguilles non amovibles ou d'embouts **Luer-Lok** solidement fixés.

Les concentrations d'antibiotiques utilisées pour les antibiogrammes conventionnels sont variables d'un laboratoire à l'autre. Il est très important de retenir une concentration équivalente à celle d'un antibiotique à tester pour le test de sensibilité **BACTEC** si l'on envisage de comparer les résultats obtenus par les deux méthodes.

Il est primordial d'ajouter la quantité exacte d'antibiotique à tester au milieu de culture pour le bon fonctionnement du test de sensibilité.

Instructions pour la conservation

Conserver les flacons d'antibiotiques **BACTEC** S.I.R.E. entre 2 – 8 °C, dans un endroit sec, à l'abri de la lumière directe du soleil. Une fois reconstitués, les réactifs se conservent jusqu'à 3 jours entre 2 – 8 °C ou jusqu'à 6 mois à une température de -20 °C ou inférieure. Congeler en aliquotes de petits volumes. Ne pas multiplier les cycles de congélation et décongélation. La date de péremption s'applique aux flacons lyophilisés non entamés, conservés selon les instructions.

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Le test de sensibilité nécessite des isolats de culture pure en phase exponentielle de croissance. Pour plus d'informations, consulter la notice d'emploi du 12B Medium (PP116JAA) et le manuel d'utilisation du système **BACTEC** 460TB (MA-0029).

METHODE

Matériaux fournis : BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Matériaux requis mais non fournis : BACTEC 12B Medium, **BACTEC** 460TB Instrument, **BACTEC** Diluting Fluid, seringue de 5 mL, eau distillée ou désionisée, seringue tuberculinique munie d'une aiguille non amovible, solution désinfectante, alcool isopropylique à 70 %.

Mode opératoire du test

Les **BACTEC** S.I.R.E. Drugs (streptomycine, isoniazide, rifampicine et éthambutol) sont fournis sous forme lyophilisée. Suivre le mode opératoire standard et respecter les concentrations d'antibiotiques indiquées. Après reconstitution dans 5 mL d'eau distillée ou désionisée et dilution (le cas échéant), les concentrations d'antibiotiques sont les suivantes :

Antibiotique	Reconstitué	Facteur de dilution	Concentration	Quantité ajoutée au 12B Medium	Quantité finale / mL de 12B Medium
Streptomycine	5 mL	————	240 µg	0,1 mL	6,0 µg
Streptomycine	5 mL	Dilution au 1/3	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Isoniazide	5 mL	————	4 µg	0,1 mL	0,1 µg*
Rifampicine	5 mL	————	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Ethambutol	5 mL	————	300 µg	0,1 mL	7,5 µg
Ethambutol	5 mL	Dilution au 1/3	100 µg	0,1 mL	2,5 µg*

*Equivalent aux concentrations critiques recommandées par le CDC.

La section IV du manuel d'utilisation du système **BACTEC** 460TB donne des exemples de concentrations équivalentes en milieux conventionnels pour les antibiotiques primaires et secondaires.

S'il est nécessaire de diluer l'antibiotique pour parvenir à la concentrations souhaitée (voir ci-dessus), diluer en conditions aseptiques avec de l'eau distillée ou désionisée. Bien agiter.

Milieu contenant l'antibiotique : Utiliser une solution d'antibiotique fraîchement préparée ou décongeler un tube de solution mère d'antibiotique congelé. A l'aide d'une seringue de 1 mL à usage unique, ajouter exactement 0,1 mL de solution dans un flacon de **BACTEC** 12B Medium de 4 mL. Utiliser une seringue distincte pour chaque antibiotique. Veiller à ne pas introduire de bulles d'air dans la seringue et ne pas utiliser la dernière portion de 0,1 mL de la seringue. Pré-tester tous les flacons de 12B Medium sur le système **BACTEC** 460TB Instrument afin d'établir une atmosphère de CO_2 dans les flacons et de repérer ceux dont l'IC est supérieur ou égal à 20.

Préparation de l'inoculum bactérien : Utiliser des cultures de *M. tuberculosis* en phase exponentielle de croissance en 12B Medium ou sur milieux solides pour préparer le test de sensibilité.

Une fois que l'IC d'un flacon de **BACTEC** 12B est supérieure ou égale à 10, incuber de nouveau le flacon et le tester quotidiennement. Le tableau suivant indique à quel moment préparer le test de sensibilité.

MESURE QUOTIDIENNE	ACTION
IC de 300 à 499	Incuber un jour de plus, puis préparer le test.
IC de 500 à 799	Préparer le test le jour même.
IC ≥ 800	Diluer au 1/2 avec 1 mL de liquide de dilution ; préparer le test.

Si le test de sensibilité est retardé, réfrigérer le flacon de milieu 12B. A ce stade, le test de sensibilité doit être préparé dans les 7 jours.

Préparer un inoculum bactérien homogène en aspirant et en expulsant à plusieurs reprises le milieu dans le flacon à l'aide d'une seringue à usage unique munie d'un aiguille non amovible sans retirer l'aiguille du bouchon en caoutchouc du flacon. Cet inoculum est utilisé directement pour l'antibiogramme.

Milieu de culture solide : Réaliser une suspension homogène de plusieurs colonies prélevées sur milieu solide. La culture doit être âgée de 4 à 5 semaines au maximum. Ajuster la densité de la suspension à celle d'un standard McFarland 1,0 pour le programme quotidien et 0,5 pour le programme hors week-end. Si la viabilité ou l'âge de la culture est douteuse, la repiquer sur 12B Medium pour obtenir de nouvelles colonies.

Ensemencement : Disposer les flacons de 12B Medium dans un portoir et les étiqueter comme il convient (contrôle, streptomycine, isoniazide, rifampicine et éthambutol habituellement). Un flacon de chaque concentration d'antibiotique et un flacon de contrôle sont nécessaires. (Les supports d'expédition en carton peuvent servir de portoir.)

Sous une hotte biologique de sécurité (et les mains gantées), ensemencer chacun des flacons de **BACTEC** 12B Medium contenant un antibiotique avec 0,1 mL de la suspension bactérienne. Utiliser une seringue tuberculinique jetable munie d'une aiguille non amovible pour effectuer cette opération.

Pour le flacon de contrôle, ne pas ensemencer directement la suspension, mais la diluer au préalable au 1/100 en transférant 0,1 mL de suspension dans 9,9 mL de liquide de dilution. Bien homogénéiser la solution en retournant au moins 10 fois le flacon, puis ensemencer le flacon de contrôle de 12B Medium (sans antibiotique) avec 0,1 mL de cette dilution.

Frotter le dessus de chaque flacon ensemencé avec une compresse imbibée d'un désinfectant approprié, puis nettoyer avec un tampon imbibé d'alcool à 70 %. Incuber à 37 ± 1 °C.

Périodicité de lecture :

Lecture quotidienne : Tester quotidiennement les flacons (y compris les week-ends et les jours fériés) à la même heure environ chaque jour (± 2 h) sur un système **BACTEC** 460TB jusqu'à obtention d'un IC supérieur ou égal à 30 dans le flacon de contrôle. Tester pendant 4 jours au minimum et 12 jours au maximum. Avec ce programme de test, il est possible de préparer un test de sensibilité n'importe quel jour de la semaine.

Lecture hors week-end : La méthode employée est similaire à celle du programme de test quotidien présenté ci-dessus avec les exceptions suivantes : [7] (a) Les cultures positives sont regroupées par lot et les tests de sensibilité sont préparés le vendredi uniquement. Suivre le mode opératoire décrit plus haut. (b) Si un flacon **BACTEC** positif est employé, voir le tableau ci-dessus.

Commencer à tester les flacons ensemencés le lundi, en passant le week-end. Tester au minimum les flacons les lundis, mardis et mercredis (au moins 5 jours après l'ensemencement jusqu'à 12 jours au maximum) à la même heure environ chaque jour (± 2 h).

Antibiogramme direct : Si un frottis de l'échantillon avec coloration acido-résistante est positif, il contient habituellement assez de mycobactéries pour effectuer un antibiogramme en 12B Medium. La méthode est pour l'essentiel identique à celle du test de sensibilité indirect. Le mode opératoire diffère sur les points suivants :

Une fois l'échantillon traité, ensemencer les milieux de culture et réaliser un frottis avec coloration acido-résistante. Conserver le reste du concentré d'échantillon au réfrigérateur.

Examiner le frottis avec coloration acido-résistante. S'il est positif par la méthode de Ziehl-Neelsen ou la méthode au fluorochrome, préparer le test de sensibilité le jour même.

Ajouter du **BACTEC PANTA** à tous les flacons contenant ou non (contrôle) des antibiotiques. Ajouter 0,1 mL de concentré d'échantillon bien mélangé à tous les flacons contenant des antibiotiques. Diluer le concentré d'échantillon au 1/10 et ensemencer le flacon de contrôle avec 0,1 mL de la dilution. Incuber les flacons à 37 °C et les tester sur le système **BACTEC** 460TB tous les 2 à 3 jours pendant 21 jours au maximum. Tester quotidiennement les échantillons dont le frottis est fortement positif.

Interpréter les résultats lorsque l'IC du contrôle est supérieur ou égal à 20. Confirmer les résultats par un antibiogramme indirect. Rapporter les résultats une fois l'identification de *M. tuberculosis* confirmée par un test **BACTEC** NAP ou autre.

Contrôle de qualité

NE PAS UTILISER les flacons au-delà de leur date de péremption.

NE PAS UTILISER de flacon fêlé ou défectueux ; éliminer ces flacons conformément aux procédures en vigueur.

Des certificats de contrôle de qualité se trouvent dans chaque trousse S.I.R.E. Drug Kit. Les certificats de contrôle de qualité identifient les microorganismes de contrôle utilisés pour ce type de produit.

Avant l'emploi, inspecter les flacons et s'assurer qu'ils ne sont pas détériorés. Ne pas utiliser un flacon dont le milieu est trouble, contaminé ou décoloré (foncé). Ne pas utiliser les flacons d'antibiotiques S.I.R.E. présentant des signes d'humidité (n'ayant pas un aspect velouté). Contrôler les performances des antibiotiques en effectuant des antibiogrammes avec une ou plusieurs souches de contrôle de qualité pour chacun des tests de sensibilité préparés.

Réf. ATCC	Souche
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv Sensible aux antibiotiques S.I.R.E.
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv Résistant à la streptomycine
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv Résistant à l'isoniazide
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv Résistant à l'éthambutol
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv Résistant à la rifampicine

Inclure systématiquement la souche ATCC 27294 H37Rv, qui devrait toujours être sensible. Si cette culture présente une résistance à l'un des antibiotiques ou si le contrôle de test de sensibilité d'une culture ne se développe pas (dans les 12 jours), ne pas rapporter les résultats. Répéter le test.

Des flacons témoins (**BACTEC** Performance Test Kit) sont testés sur le système **BACTEC** dans le cadre du programme d'entretien journalier. Si les valeurs mesurées sont basses alors que les flacons témoins ont été testés correctement, il est possible que l'appareil soit en cause (voir la notice d'emploi **BACTEC** PTK [PP046JAA]).

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, 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 CLSI (précédemment NCCLS) et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Lorsque l'IC des flacons de contrôle est supérieur ou égal à 30, interpréter les résultats comme suit : Si le Δ IC du flacon contenant l'antibiotique est inférieur à celui du flacon de contrôle, la population et sensible ; s'il est supérieur, elle est résistante.

Δ IC (contrôle) > Δ IC (antibiotique) – « sensible »

Δ IC (contrôle) < Δ IC (antibiotique) – « résistant »

Δ IC (contrôle) ≈ Δ IC (antibiotique) – « faible »

Le tableau suivant récapitule les résultats obtenus pour *M. tuberculosis* cultivé sur milieu solide et analysé avec le test de sensibilité **BACTEC**. Des données similaires ont été obtenues pour *M. tuberculosis* cultivé initialement sur 12B Medium. Cependant, en raison du plus faible nombre de cellules dans l'inoculum, les mesures initiales peuvent être inférieures.

Valeurs quotidiennes d'IC					
Jour	Contrôle	Streptomycine	Isoniazide	Rifampicine	Ethambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
ΔIC	+41	+2	+250	+2	-9
Résultats	—	Sensible	Résistant	Sensible	Sensible

LIMITES DE LA PROCEDURE

Des variations dans la préparation de l'inoculum ont une influence sur les résultats des tests de sensibilité, notamment la présence d'agrégats de grande taille ou une dilution au 1/100 incorrecte du flacon de contrôle. Si le contrôle de croissance ne donne pas les résultats escomptés, il faut recommencer le test.

Contamination

Veiller à ne pas contaminer le flacon **BACTEC** 12B pendant l'ensemencement. Un échantillon contaminé donnera une lecture positive mais n'indiquera pas un échantillon à valeur clinique. Cette détermination doit être effectuée par l'utilisateur sur la base de facteurs comme le type de microorganisme récupéré, l'apparition du même microorganisme dans plusieurs cultures, les antécédents du malade, les contrôles appropriés des équipements, etc. Cette contamination peut également provenir d'un entretien insuffisant des aiguilles et des tubulures **BACTEC**, d'un bouchon mal nettoyé ou d'un mauvais fonctionnement du système de chauffage des aiguilles **BACTEC** (consulter le Manuel d'utilisation et d'entretien de la hotte B.K.).

En raison de la nature du matériel biologique présent dans les milieux de culture et de la variabilité inhérente aux microorganismes, l'utilisateur doit savoir qu'une variation des résultats est possible lors de la mise en évidence de certains microorganismes.

VALEURS ATTENDUES

Avec la rifampicine, la streptomycine et l'isoniazide, lorsque la population est sensible, on observe habituellement une diminution marquée de l'indice de croissance (IC) en quelques jours. Avec l'éthambutol, on observe habituellement une légère augmentation initiale de l'IC, suivie d'une diminution. Le taux de décroissance de l'IC est fonction de la vitesse d'action de l'antibiotique et de la sensibilité des bactéries. Si une culture de *M. tuberculosis* comporte une population mixte de microorganismes sensibles et résistants, les valeurs de ΔIC évoluent en fonction du temps suivant le pourcentage de population sensible.

La réussite globale du test de sensibilité direct et le délai moyen d'obtention des résultats dépendent de la positivité du frottis. Le délai moyen, rapporté par différents auteurs, d'obtention de résultats présentant une bonne concordance avec les tests conventionnels est de 10 – 12 jours.[8,9]

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Plusieurs études rapportent que les résultats obtenus avec le test de sensibilité **BACTEC** se comparent favorablement à ceux obtenus avec la méthode des proportions traditionnelle (sur milieux 7H10/7H11) ou avec la méthode du ratio de résistance (sur milieu à l'œuf de Lowenstein-Jensen). [1,10-15] La précision et la reproductibilité du test de sensibilité **BACTEC** ont également été évaluées, sur des résultats obtenus habituellement en 4 – 6 jours.[16-20]

Une étude par Huang et al. comparant le système **BACTEC** 460TB à la méthode des proportions a donné les résultats suivants :[21]

Tableau 1. Comparaison entre des résultats de test de sensibilité aux antimicrobiens et des indices de performance diagnostique obtenus sur 47 isolats de *M. tuberculosis* avec le système BACTEC 460TB, et la méthode de dilution en gélose.

	Nb. d'isolats ayant des résultats spécifiés†				Indices de performance diagnostique	
Antibiotique, méthode et concentration de l'antibiotique*	BLes deux S	Les deux R	Agar S **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** S	Spécificité (%)	Sensibilité (%)
STR						
BACTEC 2,0 µg/mL	36	9	0	2	100	81,8
INH						
BACTEC 0,1 µg/mL	16	29	1	1	94,1	96,7
RMP						
BACTEC 2,0 µg/mL	30	14	1	2	96,8	87,5
EMB						
BACTEC 2,0 µg/mL	35	2	4	6	89,7	25

*Dans la méthode de dilution en gélose, les antibiotiques étaient testés aux concentrations suivantes : STR, 2 µg/mL ; INH, 0,2 µg/mL ; RMP, 1,0 µg/mL ; et EMB, 5 µg/mL.

†S = sensible ; R = résistant.

Bemer *et al.* ont comparé le système **BACTEC** 460TB S.I.R.E. au système **BACTEC MGIT** 960 S.I.R.E. 110 souches ont été testées et un pourcentage de concordance globale de 93,5 % a été obtenu. Le délai moyen d'obtention d'un résultat était de 4 à 10 jours pour le système **BACTEC** 460TB S.I.R.E., avec une médiane de 7 jours.[22]

Tableau 2. Comparaison des résultats de test de sensibilité de *M. tuberculosis* aux antimicrobiens obtenus avec le système BACTEC MGIT 960 et le système BACTEC 460TB.†

		Nb. de résultats :				
Antibiotique (µg/mL)	Nb. de tests	S avec les deux tests	R avec **MGIT** 960; S avec 460TB	S avec **MGIT** 960; R avec 460TB	R avec les deux tests	Concordance (%)
INH (0,1)	110	81	4		25	96,4
INH (0,4)	29	5	3		21	89,7
RIF (2,0)	110	92	1		17	99,1
EMB (2,5)	110	93	3	1	13	96,4
EMB (7,5)	17	7	3		7	82,4
STR (2,0)	110	76	9		25	91,8
STR (6,0)	34	12	10		12	70,6
Total des tests	520	366	33	1	120	93,5

†S, sensible ; R, résistant.

Bergmann et Woods ont comparé les résultats obtenus pour l'éthambutol et la streptomycine avec le système **BACTEC** 460TB S.I.R.E. et la méthode des proportions. Les résultats sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :[23]

Tableau 3. Comparaison des résultats de test de sensibilité obtenus initialement pour l'éthambutol et la streptomycine avec le système BACTEC et la méthode des proportions.†

	Nb. de résultats :		
Antibiotique	Système **BACTEC**	MOP	Nb. d'isolats
Ethambutol	S	S	63
	R	R	8
	S	R	3
Streptomycine	S	S	59
	R	R	14
	R	S	1

†Abréviations : MOP, méthode des proportions ; S, sensible ; R, résistant.

Dans une autre étude, Bergmann et Woods ont comparé les résultats obtenus pour l'isoniazide et la streptomycine avec le système **BACTEC** 460TB S.I.R.E. et la méthode des proportions :[24]

Tableau 4. Comparaison des résultats définitifs de test de sensibilité obtenus sur des isolats cliniques de *M. tuberculosis* avec le système BACTEC 460TB et la méthode des proportions.

	Nb. d'isolats[a] :	
Antibiotique et résultat	MOP	**BACTEC** 460TB
Isoniazide (faible[b])		
Sensible	16	16
Résistant	4	4
Isoniazide (élevé[c])		
Sensible	19	18
Résistant	1	2
Rifampin		
Sensible	17	17
Résistant	3	3

[a]MOP, méthode des proportions

[b]Faible, 0,2 µg/mL pour la méthode des proportions et 0,1 µg/mL pour **BACTEC** 460TB.

[c]Elevé, 1,0 µg/mL pour la méthode des proportions et 0,4 µg/mL pour **BACTEC** 460TB.

CONDITIONNEMENT

No réf.	**Description**
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 flacons de streptomycine lyophilisée, 2 flacons d'isoniazide lyophilisée, 2 flacons de rifampicine lyophilisée, 2 flacons d'éthambutol lyophilisé
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 flacon d'isoniazide lyophilisée.
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 par carton.

BIBIOGRAPHIE : voir la section "References" dans la notice en anglais.

BD BACTEC S.I.R.E. Drug Kit

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

Das **BACTEC** S.I.R.E.-Arzneimittelkit enthält Antibiotika zur Verwendung mit dem **BACTEC** 12B-Medium beim Test auf *Mycobacterium tuberculosis*. Die Fläschchen werden vornehmlich zusammen mit dem **BACTEC** 460TB-Gerät verwendet.

BACTEC S.I.R.E.-Arzneimittel (Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol) werden als Zusätze zu **BACTEC** 12B-Kulturmedium für qualitative Empfindlichkeitstests von *M. tuberculosis* aus einer Kultur verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das **BACTEC**-Verfahren zum Testen von Mykobakterien auf Arzneimittelempfindlichkeit basiert auf demselben Prinzip wie die herkömmliche Methode, außer, dass hierbei ein flüssiges Medium verwendet wird und die Kolonien nicht nach ca. 3 Wochen gezählt werden sondern das Wachstum radiometrisch überwacht und die Ergebnisse innerhalb von 4 – 12 Tagen interpretiert werden können. Die **BACTEC**-Arzneimittelempfindlichkeit lässt sich durch eine modifizierte Version der herkömmlichen Proportionsmethode bestimmen.[1] Als kritische Proportion für die Resistenz wird 1 % für alle Arzneimittel gegen Tuberkulose angenommen. Dies bedeutet, dass wenn 1 % oder mehr der mykobakteriellen Testpopulation resistent ist, die Kultur für Labordokumentationszwecke ebenfalls als negativ betrachtet wird. Die Resistenz wird durch einen Vergleich der Wachstumsrate im Kontrollfläschchen und in den 12B-Mediumfläschchen mit Testarznei bestimmt.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Das Grundprinzip des radiometrischen **BACTEC**-Empfindlichkeitstests für Mykobakterien gleicht dem beim primären Isolationsverfahren. Wenn Mykobakterien im 7H12-Medium mit ^{14}C-markiertem Nährboden wachsen, verbrauchen sie diesen Nährboden und bilden $^{14}CO_2$. Die Menge an erfasstem $^{14}CO_2$ spiegelt die Wachstumsrate und -menge im Fläschchen wider und lässt sich als Wachstumsindex, dem so genannten „Growth Index, GI" beziffern. Wenn dem Medium ein Arzneimittel gegen Tuberkulose zugesetzt wird, wird das Wachstum gehemmt, wenn die Testorganismen empfindlich sind. Diese Hemmung lässt sich entweder durch einen Abfall oder einen sehr geringen Anstieg des täglichen GI-Werts im Vergleich zur Kontrolle ermitteln. Wenn die Organismen jedoch resistent sind, ist die Hemmung nur gering oder gar nicht vorhanden.

Um die 1%ige Resistenzproportion zu ermitteln, ist die Konzentration des im Kontrollfläschchen enthaltenen bakteriellen Inokulums hundert Mal geringer als die im Fläschchen mit dem Arzneimittel. Die Arzneimittel- und Kontrollfläschchen werden täglich nach der Inokulation getestet. Die Anstiegsrate des GI-Wertes oder der Änderungsgrad gegenüber dem vorherigen Tag, wird als Delta GI (Δ GI) bezeichnet und liefert einen Vergleich zwischen dem Kontrollfläschchen und den Fläschchen mit den Arzneimitteln. Wenn der tägliche GI-Wert im Arzneimittelfläschchen gleich dem oder größer als der Anstieg im Kontrollfläschchen ist, ist davon auszugehen, dass die Testorganismen resistent gegenüber der Arznei sind. Bei einer empfindlichen Population ist der tägliche Anstieg des GI-Wertes höher als der des Arzneimittelfläschchens. Wenn beispielsweise 1 % der mykobakteriellen Population resistent gegenüber Isoniazid (INH) ist, würden 99 % der Organismen durch INH gehemmt und nur 1 % würden im Arzneimittelfläschchen wachsen. Die Wachstumsrate im Arzneimittelfläschchen wäre gleich der Wachstumsrate im Kontrollfläschchen, in dem das ursprüngliche bakterielle Inokulum nur 1/100 des Inokulums im Arzneimittelfläschchen ausmacht.

REAGENZIEN

Die **BACTEC** S.I.R.E.-Arzneifläschchen enthalten vor der Behandlung die folgenden aktiven Bestandteile:

Lyophilisierte Antibiotika, jedes Fläschchen:

Streptomycin	1,2 mg
Isoniazid	0,02 mg
Rifampin	0,4 mg
Ethambutol	1,5 mg

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Dieses Produkt enthält Naturkautschuk (getrocknet).

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z. B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut und anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"[2-5] sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten.

Vor Gebrauch muss jedes Fläschchen auf Anzeichen von Beschädigung, Verfall oder Kontamination überprüft werden. Fläschchen, die Anzeichen von Kontamination aufweisen, NICHT VERWENDEN. Fläschchen, die Anzeichen von Beschädigung aufweisen, müssen entsorgt werden. In seltenen Fällen kann der gläserne Fläschchenhals einen Sprung haben und beim Entfernen des Abrissdeckels oder während der Handhabung des Fläschchens brechen.

Bevor aus positiven Kulturfläschchen mit 12B-Medium für Mykobakterien eine Probenentnahme zur Anlage von Subkulturen oder für Färbungen erfolgen kann, ist das sich als Folge des mikrobiellen Stoffwechsels möglicherweise angesammelte Gas abzulassen. Aseptische Techniken und anerkannte Verfahren zum Schutz vor mikrobieller Gefährdung müssen zu allen Zeiten befolgt werden. Die Arbeitsschritte müssen an einer geeigneten biologischen Sicherheitswerkbank in einem Raum mit einem entsprechenden Belüftungssystem in Anlehnung an die Empfehlungen der CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) durchgeführt werden.[6] Während der Handhabung von Proben und Kulturen potenziell pathogener Mikroorganismen sollte Schutzkleidung, einschließlich Kittel, Handschuhe und Gesichtsmaske, getragen werden. Befolgen Sie bitte die Empfehlungen der CDC und der OSHA (U.S. Occupational Safety and Health Administration).

Um potenzielle Sickerverluste bei der Inokulation von Proben so weit wie möglich auszuschließen, sollten Spritzen mit fest eingesetzten Kanülen oder mit fest verschlossenem **Luer-Lok**-Kegel verwendet werden.

Die für herkömmliche Empfindlichkeitstests verwendeten Arzneimittelkonzentrationen können von Labor zu Labor unterschiedlich sein. Es ist äußerst wichtig, die gleiche Konzentration einer Testarznei für den **BACTEC**-Empfindlichkeitstest zu verwenden, wenn die beiden Methoden miteinander verglichen werden sollen.

Die Zugabe der korrekten Menge einer Testarznei zum Kulturmedium ist ein ausschlaggebender Schritt beim Empfindlichkeitstest.

Aufbewahrung

BACTEC S.I.R.E-Arzneimittelfläschchen müssen an einem kühlen (2 – 8 °C), trockenen Ort aufbewahrt werden, wo sie nicht direkter Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind. Nach der Rekonstituierung dürfen sie nicht länger als 3 Tage bei 2 – 8 °C oder in gefrorenem Zustand bei mindestens -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt werden. In geringen Mengen einfrieren. Nach dem Auftauen nicht erneut einfrieren. Das Verfallsdatum bezieht sich auf ungeöffnete Lyophilisat-Fläschchen, die vorschriftsmäßig gelagert wurden.

PROBENENTNAHME

Für Empfindlichkeitstests werden isolierte, aktiv wachsende Reinkulturen verwendet. Einzelheiten entnehmen Sie bitte der Packungsbeilage zum 12B-Medium (PP116JAA) und dem Produkt- und Verfahrenshandbuch (MA-0029) für das **BACTEC** 460TB-Gerätesystem.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BACTEC 12B Medium, **BACTEC** 460TB Instrument, **BACTEC** Diluting Fluid, 5-mL-Spritze, destilliertes/entionisiertes Wasser, Tuberkulinspritze mit fest eingesetzter Kanüle, Desinfektionslösung, 70 % Isopropylalkohol.

Testverfahren

BACTEC S.I.R.E.-Arzneimittel (Streptomycin, Isoniazid, Rifampin und Ethambutol) werden in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Das Standardverfahren und die Arzneimittelkonzentrationen sind zu beachten. Die Arzneimittelkonzentration nach der Rekonstituierung mit 5 mL sterilem, destilliertem/entionisiertem Wasser und nach der Verdünnung (sofern erforderlich) ist folgende:

Arzneimittel	Rekonstituiert	Verdünnungs-faktor	Konzen-tration/mL	Zum 12B-Medium zugegebene Menge	Endkonzentration im 12B-Medium/mL
Streptomycin	5 mL	————	240 µg	0,1 mL	6,0 µg
Streptomycin	5 mL	Verdünnung 1 : 3	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Isoniazid	5 mL	————	4 µg	0,1 mL	0,1 µg*
Rifampin	5 mL	————	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Ethambutol	5 mL	————	300 µg	0,1 mL	7,5 µg
Ethambutol	5 mL	Verdünnung 1 : 3	100 µg	0,1 mL	2,5 µg*

*Gleich den kritischen, von den CDC empfohlenen Konzentrationen.

Beispiele herkömmlicher Medien, die den Konzentrationen für primären und sekundären Arzneien gleichen, sind dem Produkt- und Verfahrenshandbuch, Abschnitt IV, für das **BACTEC** 460TB-Gerätesystem zu entnehmen.

Wenn eine Verdünnung erforderlich ist, um die gewünschte Arzneimittelkonzentration zu erreichen (siehe oben), aseptisch in sterilem destilliertem/deionisiertem Wasser verdünnen. Gut schütteln.

Vorbereitung des PZA-Mediums: Eine frisch vorbereitete PZA-Lösung verwenden oder ein Röhrchen mit gefrorener Stamm-PZA-Lösung auftauen. Mit einer 1-mL-Einmalspritze genau 0,1 mL in ein 4-mL-Fläschchen mit **BACTEC** 12B-Medium geben. Für jede Arznei eine separate Spritze verwenden. Darauf achten, dass keine Luftblasen in der Spritze sind und dass die letzten 0,1 mL in der Spritze nicht verwendet werden. Alle im Test verwendeten 12B-Mediumfläschchen sollten auf einem **BACTEC** 460TB-Gerät vorgetestet werden, um eine CO_2-Atmosphäre im Fläschchen zu erzeugen und alle Fläschchen mit einem GI-Wert von 20 oder mehr vom Test auszuschließen.

Vorbereitung des Inokulums: Aktiv wachsende *M. tuberculosis*-Kulturen in 12B-Medium oder auf festen Medien werden zur Durchführung der Empfindlichkeitstests verwendet.

Wenn ein **BACTEC** 12B-Fläschchen einen Wert von ≥10 aufweist, neu inkubieren und täglich testen. Siehe die folgende Übersicht bezüglich des Zeitpunkts für die Testdurchführung.

TÄGLICHES ABLESEN	MASSNAHME
GI 300 – 499	Einen weiteren Tag inkubieren und den Test dann durchführen.
GI 500 – 799	Den Test am selben Tag durchführen.
GI ≥ 800	Mit 1 mL Verdünnung im Verhältnis 1 : 2 verdünnen und den Test dann durchführen.

Wenn die Empfindlichkeitstests verschoben werden müssen, das 12B-Fläschchen im Kühlschrank aufbewahren. Zu diesem Zeitpunkt muss der jeweilige Empfindlichkeitstest innerhalb einer Woche durchgeführt werden.

Ein gleichmäßiges bakterielles Inokulum vorbereiten. Hierzu mehrere Male im Wechsel eine Einmalspritze mit einer fest eingesetzten Kanüle mit dem Medium aufziehen und das Medium wieder in das Fläschchen abgeben, ohne dabei die Nadel vom Septum des Fläschchens zu entfernen. Dieses Inokulum wird direkt für den Arzneimittel-Empfindlichkeitstest verwendet.

Feste Medienkultur: Eine homogenisierte Suspension mehrerer Kolonien auf festem Medium anlegen. Die Kultur sollte nicht älter als 4 – 5 Wochen sein. Die Suspension auf den McFarland-Trübungsstandard 1,0 einstellen, wenn täglich getestet wird und auf den Trübungsstandard 0,5, wenn nur an Werktagen (nicht an Wochenenden) getestet wird. Wenn die Lebensfähigkeit oder das Alter der Kultur ungewiss ist, eine Subkultur in einem 12B-Medium anlegen, um frisches Wachstum zu erhalten.

Inokulation: Die 12B-Mediumfläschchen in einem Gestell anordnen und korrekt beschriften (gewöhnlich mit Kontrolle, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, Ethambutol). Es wird ein Fläschchen für jede Arzneimittelkonzentration und eines für die Kontrolle benötigt. (die Versandtabletts aus Pappkarton können als Gestelle verwendet werden).

Gummihandschuhe tragen und an einer biologischen Sicherheitswerkbank arbeiten. 0,1 mL Bakterien-Suspension in jedes der **BACTEC** 12B-Mediumfläschchen mit Arzneimittel geben. Für diese Inokulation eine Einmal-Tuberkulinspritze mit einer fest eingesetzten Kanüle verwenden.

Für das Kontrollfläschchen die Suspension nicht direkt inokulieren, sondern zunächst im Verhältnis 1 : 100 verdünnen. Hierzu 0,1 mL der Suspension in 9,9 mL des speziellen Verdünners übertragen. Nach gründlichem Mischen (mindestens 10 Mal umdrehen) 0,1 mL dieser Verdünnung in das 12B-Kontrollmediumfläschchen (ohne Arzneimittel) inokulieren.

Den oberen Teil jedes inokulierten Fläschchens mit einer mit einem entsprechenden Desinfektionsmittel getränkten Gaze ausstreichen, anschließend mit einem mit 70%igem Alkohol getränkten Tupfer reinigen. Bei 37 ± 1°C inkubieren.

Zeitplan für das Ablesen:

Tägliche Tests: Die Fläschchen täglich (einschließlich an Wochenenden und Feiertagen) zu ungefähr der gleichen Zeit (± 2 h) auf einem **BACTEC** 460TB-Gerät testen, bis ein GI-Wert von 30 oder mehr im Kontrollfläschchen erreicht ist. Mindestens 4 Tage und maximal 12 Tage lang testen. Mithilfe eines Testplans kann ein Arzneimittelempfindlichkeitstest an jedem beliebigen Wochentag angesetzt werden.

Tests an Werktagen (ohne Wochenenden): Dieses Verfahren gleicht dem oben beschriebenen (tägliches Testen) mit folgenden Ausnahmen:[7] a) Alle positiven Kulturen zusammenfassen und mit den Empfindlichkeitstests ausschließlich an Freitagen beginnen. Die weiter oben beschriebenen Verfahren anwenden. b) Wenn ein positives **BACTEC**-Fläschchen verwendet wird, der Übersicht oben folgen.

Mit dem Test der inokulierten Fläschchen an einem Montag beginnen und dabei das Wochenende überspringen. Die Fläschchen sollten wenigstens am Montag, Dienstag und Mittwoch getestet werden (mindestens 5 Tage ab der Inokulation bis zu max. 12 Tagen). Dabei stets zur gleichen Zeit (± 2 h) testen.

Direkter Arzneimittelempfindlichkeitstest: Wenn eine Probe säurefeste Bakterien (AFB) auf dem Ausstrich enthält, sind üblicherweise ausreichend Mykobakterien vorhanden, um einen Arzneimittel-Empfindlichkeitstest im 12B-Medium durchzuführen. Das Verfahren ist im Wesentlichen dasselbe wie beim indirekten Empfindlichkeitstest. Folgende Abweichungen sind zu beachten:

Nach der Behandlung der Proben, die Kulturmedien inokulieren und einen Ausstrich zur AFB-Färbung anfertigen. Das restliche Probenkonzentrat im Kühlschrank aufbewahren.

Den AFB-Ausstrich untersuchen. Ist das Ergebnis mit der Ziehl-Neelsen- oder fluorochromen Methode positiv, den Empfindlichkeitstest für den gleichen Tag ansetzen.

BACTEC PANTA zu allen arzneimittelhaltigen und arzneimittelfreien (Kontroll-)Fläschchen hinzufügen. Den Fläschchen mit dem Arzneimittel 0,1 mL des gut durchmischen Probenkonzentrats hinzufügen. Das Probenkonzentrat im Verhältnis 1 : 10 verdünnen und 0,1 mL in das Kontrollfläschchen inokulieren. Bei 37 °C inkubieren und die Fläschchen alle 2 – 3 Tage für die Dauer von max. 21 Tagen auf dem **BACTEC** 460TB-Gerätesystem testen. Bei stark ausstrichpositiven Proben täglich testen.

Die Ergebnisse interpretieren, wenn der GI-Wert der Kontrolle 20 oder mehr beträgt. Die Ergebnisse mit einem indirekten Empfindlichkeitstest bestätigen. Die Ergebnisse dokumentieren, wenn der Nachweis von *M. tuberculosis* durch einen **BACTEC** NAP-Test oder andere Tests bestätigt wurde.

Qualitätskontrolle

Die Fläschchen **DÜRFEN NICHT** nach dem Verfallsdatum verwendet werden.

Fläschchen, die Sprünge oder Beschädigungen aufweisen, **DÜRFEN NICHT** verwendet werden; Fläschchen ordnungsgemäß entsorgen.

Qualitätskontrollzertifikate werden mit jedem S.I.R.E-Arzneimittelkit geliefert. Diese Zertifikate geben die für diese Art von Produkt verwendeten Testorganismen an.

Alle Fläschchen sollten vor Verwendung auf Anzeichen von Verfall überprüft werden. Fläschchen, die Trübheit, Kontaminierung oder Verfärbung (Verdunkelung) zeigen, sollten nicht verwendet werden. S.I.R.E.-Arzneifläschchen, die feucht geworden sind (Fehlen des lockeren Aussehens), sollten nicht verwendet werden. Die Leistung der Arzneimittel kann durch Empfindlichkeitstests oder durch weitere Qualitäts-Kontrollorganismen bei jeder Durchführung von Empfindlichkeitstests geprüft werden.

ATCC-Nr.	Stamm
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv empfindlich gegenüber S.I.R.E.-Arzneimitteln
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv Streptomycin-resistent
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv Isoniazid-resistent
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv Ethambutol-resistent
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv Rifampin-resistent

ATCC 27294 H37Rv sollte stets mitgetestet und stets empfindlich sein. Wenn diese Kultur eine Resistenz gegenüber einem beliebigen Arzneimittel zeigt oder wenn die Kontrolle des Empfindlichkeitstests bei einer beliebigen Kultur (innerhalb von 12 Tagen) kein Wachstum aufweist, die Ergebnisse nicht dokumentieren. Den Test wiederholen.

Als Teil des täglichen Wartungsplans sollten Funktionstest-Fläschchen (**BACTEC** Performance Test Kit) auf dem **BACTEC**-Gerät getestet werden. Wenn die Werte niedrig sind, die Funktionstest-Fläschchen jedoch korrekt getestet wurden, kann dies ein Hinweis auf mögliche Gerätestörungen sein (siehe **BACTEC** PTK-Packungsbeilage, PP046JAA).

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 CLSI (ehemals NCCLS)-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Wenn die Kontrollfläschchen einen GI-Wert von 30 oder mehr erreichen, sollten die Ergebnisse wie folgt interpretiert werden: Wenn Δ GI im Arzneimittelfläschchen geringer ist als in der Kontrolle, ist die Population empfindlich; ist Δ GI im Arzneimittelfläschchen höher als in der Kontrolle, ist die Population resistent.

Δ GI (Kontrolle) > Δ GI (Arznei) – „empfindlich"

Δ GI (Kontrolle) < Δ GI (Arznei) – „resistent"

Δ GI (Kontrolle) ≈ Δ GI (Arznei) – „Grenzbereich"

Die folgende Tabelle zeigt die gewonnenen Daten von *M. tuberculosis*, gewachsen auf einem festen Medium und getestet mit der **BACTEC**-Empfindlichkeitsmethode. Gleiche Daten wurden von ursprünglich auf einem 12B-Medium kultivierten *M. tuberculosis* erhalten. Aufgrund eines geringeren Zellanteils im Inokulum können die ursprünglichen Werte jedoch niedriger ausfallen.

Tägliche GI-Werte					
Tag	Kontrolle	Streptomycin	Isoniazid	Rifampin	Ethambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
Δ GI	+41	+2	+250	+2	-9
Ergebnisse	—	Empfindlich	Resistent	Empfindlich	Empfindlich

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Variationen bei der Vorbereitung eines Inokulums beeinträchtigen das Ergebnis der Empfindlichkeitstests, besonders bei Vorhandensein von großen Klumpen und nicht ordnungsgemäßer Verdünnung im Verhältnis 1 : 100 für das Kontrollfläschchen. Wenn das Wachstum im Kontrollfläschchen unbefriedigend ist, sollte der Test wiederholt werden.

Kontamination

Kontamination während der Inokulation in das **BACTEC** 12B-Fläschchen muss vermieden werden. Eine kontaminierte Probe ergibt einen positiven Wert ohne klinische Relevanz. Eine entsprechende Beurteilung muss vom Anwender auf der Basis von Faktoren wie z. B. Art des isolierten Organismus, Auftreten des gleichen Organismus in mehreren Kulturen, Anamnese des Patienten, geeignete Überprüfung der Geräte, usw. vorgenommen werden. Kontamination kann auch durch unsachgemäße Wartung der **BACTEC**-Kanülen und -Schläuche, durch unzureichende Reinigung des Septums oder durch Störungen im **BACTEC**-Kanülenheizer verursacht werden (vgl. Betriebs- und Wartungsanleitung der TB-Haube).

Der Anwender sollte sich bewusst sein, dass unterschiedliche Ergebnisse beim Nachweis bestimmter Keime auftreten können. Dies ist auf die Natur der in Kulturmedien enthaltenen biologischen Stoffe und auf die natürliche Variabilität von Mikroorganismen zurückzuführen.

ZU ERWARTENDE WERTE

Bei Rifampin, Streptomycin und Isoniazid gibt es üblicherweise innerhalb von wenigen Tagen einen starken Abfall des GI-Wertes, wenn die Population empfindlich ist. Bei Ethambutol gibt es üblicherweise einen geringen anfänglichen Anstieg des GI-Wertes, bevor die GI-Werte langsam fallen. Inwieweit der GI-Wert abfällt, ist von der Wirkungsgeschwindigkeit der Arznei und der Empfindlichkeit der Bakterien abhängig. Wenn eine Kultur von *M. tuberculosis* eine Mischpopulation empfindlicher und resistenter Organismen aufweist, variieren die zeitspezifischen Δ GI-Werte bezüglich des empfindlichen Populationsprozentsatzes.

Für den direkten Empfindlichkeitstest ist der Gesamterfolg und die für die Befundung erforderliche Zeit abhängig vom positiven Ausstrichergebnis. In Übereinstimmung mit herkömmlichen Testergebnissen werden durchschnittlich 10 – 12 Tage in der Fachliteratur angegeben.[8,9]

LEISTUNGSMERKMALE

Mehrere veröffentlichte Studien zeigen, dass die mit der **BACTEC**-Empfindlichkeitsmethode erzielten Ergebnisse dem Vergleich mit der herkömmlichen Proportionsmethode (mit 7H10/7H11-Medien) oder der Resistenzverhältnismethode (mit Löwenstein-Jensen-Eimedium) gut standhalten.[1,10-15] Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der **BACTEC**-Empfindlichkeitsmethode, die häufig bereits nach 4 – 6 Tagen Ergebnisse liefert, wurde ebenfalls untersucht.[16-20]

Eine Untersuchung von Huang et al., bei dem das **BACTEC** 460TB-Gerät mit der Proportionsmethode verglichen wurde, lieferte folgende Ergebnisse:[21]

Tabelle 1. Ergebnisse des Antibiotika-Empfindlichkeitstests und Diagnoseleistungsindizes, erzielt mit dem BACTEC 460TB-System im Vergleich zur Agarverdünnungsmethode, basierend auf 47 Isolaten von *M. tuberculosis*.

	Anz. der Isolate mit spezifischen Ergebnissen†				Diagnoseleistungsindizes	
Arzneimittel, Methode & Arzneimittelkonzentration*	Beide E	Beide R	Agar E **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** E	Spezifität (%)	Sensitivität (%)
STR						
BACTEC 2,0 µg/mL	36	9	0	2	100	81,8
INH						
BACTEC 0,1 µg/mL	16	29	1	1	94,1	96,7
RMP						
BACTEC 2,0 µg/mL	30	14	1	2	96,8	87,5
EMB						
BACTEC 2,0 µg/mL	35	2	4	6	89,7	25

*Bei der Agarverdünnungsmethode wurden die Arzneimittel mit folgenden Konzentrationen getestet: STR, 2 µg/mL; INH, 0,2 µg/mL; RMP, 1,0 µg/mL und EMB, 5 µg/mL.

†E = empfindlich; R = resistent.

Eine Studie von Bemer et al. verglich das **BACTEC** 460TB-S.I.R.E.-System mit dem **BACTEC MGIT** 960-S.I.R.E.-System. Einhundertzehn (110) Stämme wurden getestet und eine Gesamtübereinstimmung von 93,5 % festgestellt. Die Umschlagzeiten betrugen zwischen 4 und 10 Tagen mit **BACTEC** 460TB-S.I.R.E., bei einem Durchschnitt von 7 Tagen.[22]

Tabelle 2. Ergebnisse der Arzneimittel-Empfindlichkeitstests mit klinischen *M. tuberculosis*-Stämmen, erzielt mit BACTEC MGIT 960 und dem BACTEC 460TB-System.†

		Anz. der Ergebnisse mit folgenden Charakteristika:				
Arzneimittel (Konz. in µg/mL)	Anz. Tests	E bei beiden Tests	R beim **MGIT** 960; E beim 460TB	E beim **MGIT** 960; R beim 460TB	R bei beiden Tests	Übereinstimmung (%)
INH (0,1)	110	81	4		25	96,4
INH (0,4)	29	5	3		21	89,7
RIF (2,0)	110	92	1		17	99,1
EMB (2,5)	110	93	3	1	13	96,4
EMB (7,5)	17	7	3		7	82,4
STR (2,0)	110	76	9		25	91,8
STR (6,0)	34	12	10		12	70,6
Tests insgesamt	520	366	33	1	120	93,5

†E = empfindlich; R = resistent.

Eine Untersuchung von Bergmann und Woods verglich die **BACTEC** 460TB-S.I.R.E.-Arzneimittel Ethambutol und Streptomycin mit der Proportionsmethode. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.[23]

Tabelle 3. Erste Ergebnisse des Ethambutol- und Streptomycin-Empfindlichkeitstests, erzielt mit dem BACTEC-System und der Proportionsmethode.†

	Anz. der Ergebnisse mit folgenden Charakteristika:		
Arzneimittel	**BACTEC** System	MOP	Anz. der Isolate
Ethambutol	E	E	63
	R	R	8
	E	R	3
Streptomycin	E	E	59
	R	R	14
	R	E	1

†Abkürzungen: MOP, Methode of Proportions = Proportionsmethode; E = empfindlich; R = resistent.

In einer separaten Studie untersuchten Bergmann und Woods zudem die **BACTEC** 460TB-S.I.R.E.-Arzneimittel Isoniazid und Streptomycin und verglichen diese mit der Proportionsmethode:[24]

Tabelle 4. Ergebnisse des Empfindlichkeitstests, erzielt mit der Proportionsmethode und dem BACTEC 460TB-System.

	Anz. der Isolate mit spezifischen Ergebnissen[a]:	
Arzneimittel und Ergebnis	MOP	**BACTEC** 460TB
Isoniazid (gering[b])		
Empfindlich	16	16
Resistent	4	4
Isoniazid (hoch[c])		
Empfindlich	19	18
Resistent	1	2
Rifampin		
Empfindlich	17	17
Resistent	3	3

[a]MOP = Proportionsmethode.

[b]Gering = 0,2 µg/mL bei der Proportionsmethode und 0,1 µg/mL bei **BACTEC** 460TB.

[c]Hoch = 1,0 µg/mL bei der Proportionsmethode und 0,4 µg/mL bei **BACTEC** 460TB.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	**Beschreibung**
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 Fläschchen lyophilisiertes Streptomycin, 2 Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid, 2 Fläschchen lyophilisiertes Rifampin, 2 Fläschchen lyophilisiertes Ethambutol
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 Fläschchen lyophilisiertes Isoniazid
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 pro Karton

LITERATURNACHWEIS: S. "Reference" im englischen Text.

BD BACTEC S.I.R.E. Drug Kit

Italiano

USO PREVISTO

BACTEC S.I.R.E. Drug Kit (kit farmaci **BACTEC** S.I.R.E.) contiene farmaci da usare con **BACTEC** 12B Medium (terreno **BACTEC** 12B) nei test di *Mycobacterium tuberculosis* ed è destinato principalmente all'uso con lo strumento **BACTEC** 460TB.

I farmaci **BACTEC** S.I.R.E. (streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo) sono raccomandati come additivi del terreno di coltura **BACTEC** 12B per i test qualitativi di sensibilità di *M. tuberculosis* da cultura.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La procedura **BACTEC** per i test di sensibilità ai farmaci dei micobatteri si basa sullo stesso principio di base adottato nella metodica tradizionale, salvo che viene usato un terreno liquido e anziché contare le colonie dopo circa 3 settimane, la crescita viene monitorata con metodo radiometrico e i risultati sono refertabili entro 4 – 12 giorni. La sensibilità ai farmaci **BACTEC** si determina seguendo una versione modificata della metodica proporzionale tradizionale.[1] L'1% viene assunto come proporzione soglia di resistenza per tutti i farmaci antitubercolari. Ciò significa che se almeno l'1% della popolazione micobatterica testata è resistente, l'isolato è considerato resistente ai fini del referto di laboratorio. La resistenza si determina comparando la percentuale di crescita nel flacone di controllo e nei flaconi di terreno 12B contenenti il farmaco testato.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il principio di base del dosaggio radiometrico di sensibilità **BACTEC** per i micobatteri è simile a quello utilizzato nella procedura di isolamento primario. I micobatteri, quando crescono in un terreno 7H12 contenente substrato marcato con ^{14}C, utilizzano tale substrato e producono così $^{14}CO_2$. La quantità di $^{14}CO_2$ rilevata riflette la percentuale e l'entità di crescita che ha luogo nei flaconi ed è espressa in termini di "Indice di Crescita" (GI). L'aggiunta di un farmaco antitubercolare al terreno determina la soppressione della crescita, se i microrganismi testati sono sensibili. Questa soppressione può essere evidenziata da un calo o da un aumento leggerissimo del GI giornaliero rispetto al controllo. Se i microrganismi sono resistenti, la soppressione è tuttavia minima o inesistente.

Per determinare la proporzione 1% di resistenza, l'inoculo batterico usato nel flacone di controllo è cento volte inferiore a quello usato per il flacone contenente il farmaco. I flaconi del farmaco e del controllo sono testati ogni giorno dopo l'inoculo. Si compara quindi la percentuale di aumento nel GI, o l'entità della variazione rispetto a quella del giorno precedente, chiamata delta (Δ) GI, tra flacone di controllo e flaconi contenenti il farmaco. Se l'aumento del GI giornaliero del flacone del farmaco è uguale o superiore a quello nel flacone di controllo, i microrganismi testati sono considerati resistenti al farmaco. In caso di popolazione sensibile, l'aumento del GI giornaliero per il controllo è superiore a quello del flacone contenente il farmaco. Per esempio, se l'1% della popolazione micobatterica è resistente all'isoniazide (INH), il 99% dei microrganismi è inibito da INH e nel flacone del farmaco cresce soltanto l'1%. La percentuale di crescita nel flacone del farmaco è simile a quella nel flacone di controllo, contenente un inoculo batterico originario pari soltanto a 1/100 di quello del flacone del farmaco.

REAGENTI

I flaconi **BACTEC** S.I.R.E. Drug contengono i seguenti ingredienti attivi prima del trattamento:

Farmaci liofilizzati, ogni flacone:

Streptomicina.....1,2 mg
Isoniazide .....0,02 mg
Rifampicina .....0,4 mg
Etambutolo .....1,5 mg

Avvertenze e precauzioni:

Per uso diagnostico *in vitro*.

Questo prodotto contiene gomma naturale secca.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue o altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".[2-5]

Prima dell'uso, esaminare ciascun flacone per verificare se presenta segni di danni, deterioramento o contaminazione. NON USARE un flacone se presenta tracce di contaminazione. Eliminare i flaconi che presentano segni di danni. Raramente può succedere che il collo di un flacone di vetro sia incrinato e si rompa durante la rimozione del tappo o la manipolazione

Prima di prelevare campioni positivi da flaconi di coltura di terreno 12B per la subcoltura o la colorazione, ecc., è necessario eliminare il gas eventualmente accumulato a causa del metabolismo microbico. Durante tutte le procedure, adottare tecniche asettiche e seguire le precauzioni standard contro i rischi microbiologici. Eseguire le procedure in una cappa di sicurezza biologica appropriata in una stanza con un sistema di ventilazione adeguato in conformità alle raccomandazioni CDC.[6] Durante la manipolazione di campioni e colture di potenziali patogeni, usare camice, maschera e guanti appropriati. Seguire le raccomandazioni CDC e OSHA.

Per ridurre al minimo potenziali perdite durante l'inoculo, usare siringhe con aghi fissi o punte con raccordo di sicurezza di marca **Luer-Lok**.

La concentrazione di farmaco usata nei test di sensibilità tradizionali può variare da un laboratorio all'altro. È importante selezionare una concentrazione equivalente di farmaco per il test di sensibilità **BACTEC** nel caso in cui si debbano comparare i risultati ottenuti con le due metodiche.

L'aggiunta della corretta quantità di farmaco da testare nel terreno di coltura è decisiva per l'esito del test di sensibilità.

Istruzioni per la conservazione

Conservare i flaconi di farmaci **BACTEC** S.I.R.E. in un luogo fresco (2 – 8 °C) e asciutto, al riparo dalla luce solare diretta. Una volta ricostituiti, possono essere conservati per un massimo di 3 giorni a 2 – 8 °C oppure congelati ad almeno -20 °C per non più di sei mesi. Congelare in piccole aliquote. Non congelare e scongelare ripetutamente. La data di scadenza si riferisce al flacone liofilizzato sigillato e conservato come prescritto.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per i test di sensibilità, si usano colture pure isolate in fase di crescita attiva. Per dettagli, consultare il foglietto illustrativo del terreno 12B (PP116JAA) e il manuale relativo alla procedura e al sistema **BACTEC** 460TB (MA-0029).

PROCEDURA

Materiale fornito: BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Materiali necessari ma non forniti: BACTEC 12B Medium, strumento **BACTEC** 460TB, **BACTEC** Diluting Fluid, siringa da 5 mL, acqua distillata / deionizzata, siringa per tubercolina con ago fisso, soluzione disinfettante, alcol isopropilico al 70%.

Procedura del test

I farmaci **BACTEC** S.I.R.E. (streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo) sono forniti in forma liofilizzata. Adottare le concentrazioni di farmaci e la procedura standard. La tabella seguente illustra le concentrazioni di farmaci dopo la ricostituzione con 5 mL di acqua sterile distillata/deionizzata e dopo la diluizione (appropriata).

Farmaco	Ricostituito	Fattore di diluizione	Concentrazione/mL	Quantità aggiunta al terreno 12B	Concentrazione finale nel terreno 12B/mL
Streptomicina	5 mL	————	240 µg	0,1 mL	6,0 µg
Streptomicina	5 mL	Diluizione 1:3	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Isoniazide	5 mL	————	4 µg	0,1 mL	0,1 µg*
Rifampicina	5 mL	————	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Etambutolo	5 mL	————	300 µg	0,1 mL	7,5 µg
Etambutolo	5 mL	Diluizione 1:3	100 µg	0,1 mL	2,5 µg*

*Equivalente alle concentrazioni critiche raccomandate da CDC.

Esempi di concentrazioni equivalenti in terreni tradizionali per farmaci primari e secondari, sono riportati nella sezione IV del manuale relativo alla procedura e al sistema **BACTEC** 460TB.

Se per raggiungere la concentrazione di farmaco desiderata (vedi sopra) è necessaria una diluizione, diluire in asepsi in acqua sterile distillata/deionizzata. Agitare accuratamente.

Preparazione del terreno del farmaco: Usare una soluzione antibiotica preparata di fresco oppure scongelare una provetta di soluzione antibiotica stock congelata. Usando una siringa monouso da 1 mL, dispensare esattamente 0,1 mL in un flacone di terreno **BACTEC** 12B da 4 mL. Usare una siringa diversa per ogni farmaco. Prestare attenzione a evitare bolle d'aria nella siringa e non usare l'ultima porzione di 0,1 mL nella siringa. Tutti i flaconi di terreno 12B usati nel test devono essere pretestati con lo strumento **BACTEC** 460TB per stabilire un'atmosfera di CO_2 nel flacone ed escludere eventuali flaconi con un GI pari o superiore a 20.

Preparazione dell'inoculo batterico: Per allestire i test di sensibilità, si usano colture di *M. tuberculosis* in fase di crescita attiva in terreno 12B o in terreni solidi.

Quando un flacone **BACTEC** 12B ha una lettura ≥ 10, reincubare e testare ogni giorno. Per definire quando allestire il test di sensibilità, consultare la tabella seguente.

LETTURA GIORNALIERA	AZIONE
GI 300 – 499	Incubare ancora per un giorno e quindi allestire il test.
GI 500 -799	Allestire il test il giorno stesso.
GI ≥ 800	Diluire 1:2 con 1 mL di fluido di diluizione; allestire il test.

Se è necessario rinviare il test di sensibilità, refrigerare il flacone 12B. A questo punto, il test di sensibilità deve essere allestito entro una settimana.

Preparare un inoculo batterico uniforme aspirando alternativamente il terreno in una siringa monouso con ago fisso ed espellendolo nel flacone varie volte, senza rimuovere l'ago dal setto del flacone. Questo inoculo viene usato direttamente per il test di sensibilità ai farmaci.

Coltura in terreno solido: Preparare una sospensione omogeneizzata di alcune colonie in terreno solido. La coltura non deve essere di più di 4 – 5 settimane. Correggere la sospensione allo standard McFarland 1,0 in caso di applicazione del piano giornaliero e a 0,5 in caso di piano che non preveda il fine settimana. Se la vitalità o l'età della coltura è incerta, eseguire una subcoltura in un terreno 12B per ottenere una crescita fresca.

Inoculo: Disporre i flaconi di terreno 12B in un rack ed apporre le etichette appropriate (di solito controllo, streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo). Sono necessari un flacone per ogni concentrazione di farmaco e uno per il controllo. Come rack, è possibile usare i vassoi di cartone usati per la spedizione.

Indossando guanti di gomma e lavorando in una cappa di sicurezza biologica, inoculare 0,1 mL di sospensione batterica in ogni flacone di terreno **BACTEC** 12B contenente un farmaco. Per questo inoculo, usare una siringa monouso per tubercolina con ago fisso.

Per il flacone di controllo, non inoculare la sospensione direttamente, ma diluire prima 1:100 trasferendo 0,1 mL di sospensione in 9,9 mL di fluido di diluizione apposito. Dopo aver mescolato accuratamente, capovolgere almeno 10 volte, inoculare 0,1 mL di questa diluizione nel flacone di terreno 12B di controllo (senza farmaco).

Disinfettare la sommità di ogni flacone inoculato con una com pressa di garza inumidita con un disinfettante appropriato, quindi pulire con un tampone imbevuto di alcol al 70%. Incubare a 37 ± 1 °C.

Piano di lettura:

Piano di test giornaliero: Testare i flaconi ogni giorno (inclusi fine settimana e giorni festivi) più o meno alla stessa ora ogni giorno (± 2 h) con lo strumento **BACTEC** 460TB, finché il GI nel flacone di controllo non raggiunge almeno 30. Testare per un minimo di 4 o un massimo di 12 giorni. Seguendo questo piano di test, è possibile allestire un test di sensibilità qualsiasi giorno della settimana.

Piano con esclusione del fine settimana: La procedura è simile a quella del piano di test giornaliero sopra descritta, con le eccezioni seguenti:[7] (a) mettere in batch tutte le colture positive e allestire i testi di sensibilità soltanto il venerdì. Seguire le procedure sopra descritte. (b) Se si usa un flacone **BACTEC** positivo, consultare la tabella sopra riportata.

Iniziare a testare i flaconi inoculati il lunedì, saltando il fine settimana. Testare i flaconi almeno il lunedì, martedì e mercoledì (da un minimo di 5 giorni dal giorno di inoculo a un massimo di 12 giorni), più o meno alla stessa ora ogni giorno (± 2 h).

Test diretto di sensibilità ai farmaci: Se un campione è positivo per AFB su striscio, contiene di norma una quantità di micobatteri sufficiente per condurre un test di sensibilità ai farmaci in terreno 12B. La procedura è sostanzialmente identica al test indiretto di sensibilità. Le differenze procedurali sono le seguenti.

Una volta trattato il campione, inoculare i terreni di coltura ed eseguire uno striscio per la colorazione AFB. Refrigerare la parte restante del concentrato di campione.

Esaminare lo striscio AFB. Se risulta positivo con la metodica Ziehl-Neelsen o al fluorocromo, allestire il test di sensibilità il giorno stesso.

Dispensare **BACTEC PANTA** in tutti i flaconi contenenti farmaci e di controllo (senza farmaco). Dispensare 0,1 mL di concentrato di campione accuratamente mescolato nei flaconi contenenti farmaco. Diluire il concentrato di campione 1:10 e inoculare 0,1 mL nel flacone di controllo. Incubare a 37 °C e testare i flaconi con lo strumento **BACTEC** 460TB ogni 2 – 3 giorni per un massimo di 21 giorni. In caso di campioni altamente positivi allo striscio, testare ogni giorno.

Interpretare i risultati quando il GI del controllo raggiunge almeno 20. Confermare i risultati con un test indiretto di sensibilità. Refertare i risultati dopo aver confermato l'identificazione di *M. tuberculosis* mediante test **BACTEC** NAP o altri test.

Controllo di qualità

NON USARE i flaconi oltre la data di scadenza.

Non usare flaconi che presentano incrinature o difetti; eliminare il flacone in modo appropriato.

Certificati di controllo qualità sono allegati a ogni kit di farmaci S.I.R.E. I certificati di controllo di qualità riportano i microrganismi per il test utilizzati per questo tipo di prodotto.

Prima dell'uso, l'utente deve esaminare tutti i flaconi per verificare se presentano segni di deterioramento. Non usare flaconi che presentano torbidità, contaminazione, alterazione di colore (assunzione di una colorazione più scura). Non usare i flaconi di farmaci S.I.R.E. che presentano umidità (assenza di aspetto fioccoso). Le performance dei farmaci possono essere controllate mediante test di sensibilità di uno o più microrganismi per controllo di qualità con ogni test di sensibilità allestito.

N. ATCC	Ceppo
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv sensibile ai farmaci S.I.R.E.
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv streptomicino-resistente
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv isoniazide-resistente
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv etambutolo-resistente
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv rifampicino-resistente

ATCC 27294 H37Rv deve essere sempre incluso e risultare sempre sensibile. Se questa coltura presenta resistenza a un farmaco o il controllo del test di sensibilità di una coltura non cresce (entro 12 giorni), non refertare i risultati. Ripetere il test.

Nell'ambito del programma di manutenzione giornaliera, testare i flaconi per test della performance (kit per test della performance **BACTEC**) con lo strumento **BACTEC**. Se si ottengono letture basse, ma i flaconi per test della performance sono stati testati correttamente, è possibile che vi sia qualche problema allo strumento (vedere il foglietto illustrativo di **BACTEC** PTK, PP046JAA)

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 del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI (già NCCLS) in merito.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Quando il flacone di controllo raggiunge un GI pari ad almeno 30, i risultati vanno interpretati come segue. Se ΔGI nel flacone del farmaco è inferiore a quello del controllo, la popolazione è sensibile, mentre se è superiore, la popolazione è resistente.

ΔGI (controllo) > ΔGI (farmaco) – "sensibile"

ΔGI (controllo) < ΔGI (farmaco) – "resistente"

ΔGI (controllo) ≈ ΔGI (farmaco) – "borderline"

La tabella seguente presenta i dati ottenuti da ceppi di *M. tuberculosis* cresciuti su terreno solido e testati usando la metodica di test di sensibilità **BACTEC**. Dati simili sono stati ottenuti da ceppi di *M. tuberculosis* inizialmente cresciuti in terreno 12B. Data la minore quantità di cellule nell'inoculo, le letture iniziali possono tuttavia essere inferiori.

Lettura GI giornaliera					
Giorno	Controllo	Streptomicina	Isoniazide	Rifampicina	Etambutolo
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
Δ GI	+41	+2	+250	+2	-9
Risultati	—	Sensibile	Resistente	Sensibile	Sensibile

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Variazioni nella preparazione dell'inoculo incidono sull'esito dei test di sensibilità ai farmaci, in particolare la presenza di grumi macroscopici e una diluizione 1:100 inappropriata per il flacone di controllo. Se la crescita nel flacone di controllo non è soddisfacente, ripetere il test.

Contaminazione

Prestare attenzione a evitare contaminazioni durante l'inoculo nel flacone **BACTEC** 12B. Un campione contaminato produce una lettura positiva, senza però indicare un corrispondente campione clinico. La determinazione di contaminazione deve essere effettuata dall'utente sulla base di fattori quali il tipo di microrganismo recuperato, la presenza dello stesso microrganismo in più colture, l'anamnesi del paziente, appropriati controlli delle apparecchiature, ecc. La contaminazione può essere dovuta anche a errata manutenzione di aghi e tubi **BACTEC**, a insufficiente pulizia del setto o al malfunzionamento dell'unità di riscaldamento degli aghi **BACTEC** (vedere il manuale d'uso e manutenzione della cappa TB).

Data la natura dei materiali biologici nei prodotti dei terreni e della variabilità intrinseca dei microrganismi, l'utente deve essere consapevole di potenziali risultati variabili nel recupero di alcuni microrganismi.

VALORI ATTESI

In caso di popolazione sensibile, con rifampicina, streptomicina e isoniazide si riscontra solitamente una marcata diminuzione nel GI entro pochi giorni, mentre l'etambutolo è di norma associato a un piccolo aumento iniziale nel GI, seguito poi da un calo dei valori GI. La misura in cui cala il GI dipende dalla rapidità di azione del farmaco e dalla sensibilità dei batteri. Se una coltura di *M. tuberculosis* ha una popolazione mista di microrganismi sensibili e resistenti, i valori ΔGI rispetto al tempo tendono a variare in relazione alla percentuale della popolazione sensibile.

Per il test diretto di sensibilità, il successo complessivo e il tempo necessario per il referto dipendono dalla positività dello striscio. La letteratura documenta una media di 10 – 12 giorni, con una buona concordanza con risultati di test tradizionali.[8,9]

PERFORMANCE

Alcuni studi pubblicati hanno dimostrato che i risultati ottenuti con la metodica di sensibilità **BACTEC** equivalgono a quelli conseguiti con la tradizionale metodica proporzionale (che impiega terreni 7H10/7H11 media) o del rapporto di resistenza (che utilizza il terreno all'uovo Lowenstein-Jensen).[1,10-15] L'accuratezza e la riproducibilità della metodica di sensibilità **BACTEC** è stata anch'essa valutata, con risultati spesso ottenuti entro 4 – 6 giorni.[16-20]

Uno studio di Huang et al. sulla comparazione del sistema **BACTEC** 460TB con la metodica della proporzioni, ha dato i seguenti risultati.[21]

Tabella 1. Risultati dei test di sensibilità ai farmaci e indici di performance diagnostici determinati con il sistema BACTEC 460TB rispetto alla metodica di diluizione in agar, basati su 47 isolati di *M. tuberculosis*.

	N. di isolati con risultati specifici†				Indici di performance diagnostici	
Farmaco, metodica e concentrazione farmaco*	Entrambi S	Entrambi R	Agar S **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** S	Specificità (%)	Sensibilità (%)
STR						
BACTEC 2,0 µg/mL	36	9	0	2	100	81,8
INH						
BACTEC 0,1 µg/mL	16	29	1	1	94,1	96,7
RMP						
BACTEC 2,0 µg/mL	30	14	1	2	96,8	87,5
EMB						
BACTEC 2,0 µg/mL	35	2	4	6	89,7	25

*Nella metodica di diluizione in agar, i farmaci sono stati testati alle concentrazioni seguenti: STR 2 µg/mL, INH, 0,2 µg/mL, RMP, 1,0 µg/mL e EMB, 5 µg/mL.

†S = sensibile; R = resistente.

Uno studio di Bemer et al. ha comparato il sistema **BACTEC** 460TB S.I.R.E. al sistema **BACTEC MGIT** 960 S.I.R.E. Sono stati testati centodieci ceppi, con una concordanza complessiva del 93,5%. I tempi di completamento sono risultati tra 4,0 – 10,0 giorni di **BACTEC** 460TB S.I.R.E., con una mediana di 7,0 giorni.[22]

Tabella 2. Risultati dei test di sensibilità ai farmaci di ceppi clinici di *M. tuberculosis* determinati dai sistemi BACTEC MGIT 960 E BACTEC 460TB.†

		N. di risultati:				
Farmaco (conc. in µg/mL)	N. di test	S con entrambi i test	R con **MGIT** 960; S con 460TB	S con **MGIT** 960; R con 460TB	R con entrambi test	Concordanza (%)
INH (0,1)	110	81	4		25	96,4
INH (0,4)	29	5	3		21	89,7
RIF (2,0)	110	92	1		17	99,1
EMB (2,5)	110	93	3	1	13	96,4
EMB (7,5)	17	7	3		7	82,4
STR (2,0)	110	76	9		25	91,8
STR (6,0)	34	12	10		12	70,6
Tests insgesamt	520	366	33	1	120	93,5

†S, sensibile; R, resistente.

Uno studio di Bergmann e Woods ha comparato i farmaci **BACTEC** 460TB S.I.R.E. etambutolo e streptomicina con la metodica delle proporzioni. La tabella seguente riporta i risultati.[23]

Tabella 3. Risultati iniziali dei test di sensibilità a etambutolo e streptomicina mediante BACTEC e metodica della proporzione.†

	N. di risultati:		
Farmaco	Sistema **BACTEC**	MOP	N. di isolati
Ethambutol	S	S	63
	R	R	8
	S	R	3
Streptomicina	S	S	59
	R	R	14
	R	E	1

†Abbreviazioni: MOP, metodica delle proporzioni; S, sensibile; R, resistente.

In uno studio separato, Bergmann e Woods ha esaminato anche i farmaci **BACTEC** 460TB S.I.R.E. isoniazide e streptomicina, comparandoli con la metodica delle proporzioni.[24]

Tabella 4. Risultati dei test di sensibilità risolti per isolati clinici di *M. tuberculosis* mediante metodica delle proporzioni, BACTEC 460TB.

	N. di isolati con risultati mediante[a]:	
Farmaco e risultato	MOP	**BACTEC** 460TB
Isoniazide (basso[b])		
Sensibile	16	16
Resistente	4	4
Isoniazide (alto[c])		
Sensibile	19	18
Resistente	1	2
Rifampicina		
Sensibile	17	17
Resistente	3	3

[a]MOP, metodica delle proporzioni.

[b]Basso, 0,2 µg/mL per la metodica delle proporzioni e 0,1 µg/mL per **BACTEC** 460TB.

[c]Alto, 1,0 µg/mL per la metodica delle proporzioni e 0,4 µg/mL per **BACTEC** 460TB.

DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 flaconi di streptomicina liofilizzata, 2 flaconi di isoniazide liofilizzata, 2 flaconi di rifampicina liofilizzata, 2 flaconi di etambutolo liofilizzati
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 flacone di isoniazide liofilizzata
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 per cartone

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

BD BACTEC S.I.R.E. Drug Kit

Português

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O **BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit (Kit de fármacos **BACTEC** S.I.R.E.) contém antimicrobianos para utilização com o **BACTEC** 12B Medium para teste de *Mycobacterium tuberculosis*. A sua utilização principal é com o instrumento **BACTEC** 460TB.

Os fármacos **BACTEC** S.I.R.E. (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol) são recomendados como aditivos para o **BACTEC** 12B Culture Medium, para o teste de sensibilidade qualitativo de *M. tuberculosis* a partir de cultura.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O procedimento **BACTEC** para teste de sensibilidade de micobactérias a fármacos baseia-se no mesmo princípio básico utilizado no método convencional, exceptuando o facto de ser utilizado um meio líquido e de, em vez de se contarem colónias após cerca de 3 semanas, o crescimento ser monitorizado radiometricamente e os resultados serem apresentados num período de 4 a 12 dias. Com o **BACTEC**, a sensibilidade a fármacos é determinada através de uma versão modificada do método de proporção convencional.[1] A proporção crítica para a resistência é considerada como 1% para todos os fármacos anti-tuberculose. Isto significa que se 1% ou mais da população de micobactérias em teste for resistente, a cultura é considerada resistente para fins de elaboração dos relatórios laboratoriais. A resistência é determinada comparando a velocidade de crescimento no frasco de controlo com os frascos de 12B Medium que contêm o fármaco do teste.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O princípio básico do ensaio de sensibilidade radiométrico **BACTEC** para micobactérias é idêntico ao princípio utilizado no procedimento de isolamento primário. Quando as micobactérias crescem em meio 7H12 contendo substrato marcado com ^{14}C, estas utilizam o substrato e produzem $^{14}CO_2$. A quantidade de $^{14}CO_2$ detectado reflecte a velocidade e o nível de crescimento ocorrido no frasco, e é expressa em termos de "Índice de crescimento" (IC). Quando um fármaco anti-tuberculose é adicionado ao meio, o crescimento é suprimido se os microrganismos de teste forem sensíveis. Esta supressão pode ser detectada por um declínio ou um aumento muito pequeno no IC diário, quando comparado com o controlo. Contudo, se os microrganismos forem resistentes, não ocorre supressão do crescimento ou ocorre apenas uma ligeira supressão.

Para determinar a proporção de 1% da resistência, o inóculo bacteriano utilizado no frasco de controlo corresponde a um centésimo do inóculo utilizado no frasco que contém o fármaco. Após a inoculação, os frascos do fármaco e do controlo são testados diariamente. A taxa de aumento no IC, ou seja a variação em relação ao dia anterior, denominada delta (Δ) IC, é comparada entre o frasco do controlo e os frascos que contêm os fármacos. Se o aumento do IC diário no frasco do fármaco for igual ou superior ao do frasco do controlo, os microrganismos do teste são considerados resistentes ao fármaco. Para uma população sensível, o aumento do IC diário seria maior para o controlo do que para o frasco do fármaco. Por exemplo, se 1% da população de micobactérias for resistente à isoniazida (INH), então 99% dos microrganismos será inibido pela INH e apenas 1% crescerá no frasco do fármaco. A taxa de crescimento no frasco do fármaco seria semelhante à taxa de crescimento no frasco de controlo, em que o inóculo bacteriano original corresponderia apenas a 1/100 do inóculo do frasco do fármaco.

REAGENTES

Antes do processamento, os frascos de fármacos do **BACTEC** S.I.R.E. contêm os seguintes princípios activos:

Antimicrobianos liofilizados, cada frasco:

Estreptomicina .....1,2 mg
Isoniazida .....0,02 mg
Rifampicina .....0,4 mg
Etambutol.....1,5 mg

Advertências

Para diagnóstico *in vitro*.

Este produto contém borracha natural desidratada.

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue ou outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"[2-5] e as linhas de orientação da instituição.

Antes de ser utilizado, cada frasco deve ser examinado relativamente a danos, deterioração ou contaminação. NÃO UTILIZAR nenhum frasco que apresente sinais de contaminação. Os frascos que apresentem sinais de danos, devem ser eliminados. Em raras ocasiões, o vidro do frasco poderá estar rachado e o gargalo poderá partir-se durante a remoção da tampa de encaixe ou durante a manipulação.

Antes da colheita de amostras de frascos de cultura 12B Medium positivos para repicagem, coloração, etc., é necessário libertar o gás que se poderá ter acumulado devido ao metabolismo microbiano. Utilizar sempre técnicas assépticas e cumprir as precauções estabelecidas contra perigos microbiológicos. Os procedimentos devem ser efectuados numa câmara de segurança biológica adequada, numa sala com sistema de ventilação apropriado, conforme recomendado pelo CDC.[6] Utilizar bata, máscara e luvas protectoras adequadas quando manusear as amostras e culturas de agentes potencialmente patogénicos. Seguir as recomendações do CDC e OSHA.

Para minimizar a possibilidade de fugas durante a inoculação, utilizar seringas com agulhas fixas ou pontas da marca **Luer-Lok** bem apertadas.

As concentrações dos fármacos utilizados no teste de sensibilidade convencional poderão variar de laboratório para laboratório. A selecção de uma concentração equivalente de um fármaco de teste é extremamente importante para o teste de sensibilidade **BACTEC,** caso se pretenda comparar os resultados obtidos pelos dois métodos.

A adição de uma quantidade exacta do fármaco de teste ao meio de cultura é um passo crítico no teste de sensibilidade.

Instruções de armazenamento

Os frascos de fármacos **BACTEC** S.I.R.E. devem ser armazenados num local fresco e seco (2 a 8ºC), ao abrigo da luz solar directa. Após a reconstituição, podem ser armazenados durante um período não superior a 3 dias entre 2 e 8°C, ou congelados a uma temperatura igual ou inferior a -20ºC durante um período de até seis meses. Congelar em pequenas alíquotas. Não congelar e descongelar repetidamente. O prazo de validade refere-se ao produto contido no frasco liofilizado não aberto e armazenado conforme recomendado.

COLHEITA DE AMOSTRAS

Para o teste de sensibilidade são utilizadas culturas puras isoladas em crescimento. Para obter pormenores, consulte o 12B Medium Package Insert (Folheto Informativo do 12B Medium) (PP116JAA) e o **BACTEC** 460TB System Product and Procedure Manual (Manual de Procedimentos e Produtos do Sistema **BACTEC** 460TB (MA-0029).

PROCEDIMENTO

Material fornecido: BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Material necessário mas não fornecido: BACTEC 12B Medium, Instrumento **BACTEC** 460TB, **BACTEC** Diluting Fluid, seringa de 5 mL, água destilada/desionizada, seringa de tuberculina com agulha fixa, solução desinfectante, álcool isopropílico a 70%.

Procedimento do teste

Os fármacos **BACTEC** S.I.R.E. (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol) são fornecidos sob a forma liofilizada. Deve ser seguido o procedimento padrão e utilizadas concentrações padronizadas dos fármacos. As concentrações dos fármacos após a reconstituição com 5 mL de água destilada/desionizada estéril e após a diluição apropriada são as seguintes:

Fármaco	Reconstituído	Factor de diluição	Concentração/mL	Qtd. adicionada ao 12B Medium	Concentração final no 12B Medium/mL
Estreptomicina	5 mL	————	240 µg	0,1 mL	6,0 µg
Estreptomicina	5 mL	1:3 dilution	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Isoniazid	5 mL	————	4 µg	0,1 mL	0,1 µg*
Rifampicina	5 mL	————	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Etambutol	5 mL	————	300 µg	0,1 mL	7,5 µg
Etambutol	5 mL	1:3 dilution	100 µg	0,1 mL	2,5 µg*

*Equivalente às concentrações críticas recomendadas pelo CDC.

Na secção IV do **BACTEC** 460TB Product and Procedure Manual, encontram-se exemplos de concentrações equivalentes em meios convencionais para fármacos primários e secundários.

Se for necessária alguma diluição para obter a concentração do fármaco desejada (ver acima), dilua assepticamente em água destilada/desionizada estéril. Agite bem.

Preparação do meio dos fármacos: Utilize uma solução do fármaco recém-preparada ou descongele um tubo com solução do fármaco de reserva congelada. Utilizando uma seringa de utilização única de 1 mL, adicione exactamente 0,1 mL a um frasco de **BACTEC** 12B Medium de 4 mL. Utilize uma seringa diferente para cada fármaco. Deve ter cuidado para que não existam bolhas de ar na seringa e não deve utilizar a última fracção de 0,1 mL da seringa. Todos os frascos de 12B Medium utilizados no teste devem ser previamente testados num instrumento **BACTEC** 460TB para estabelecer uma atmosfera de CO_2 no frasco e excluir os frascos com um IC igual ou superior a 20.

Preparação do inóculo bacteriano: Para preparar o teste de sensibilidade são utilizadas culturas de *M. tuberculosis* em crescimento em 12B Medium ou em meios sólidos.

Quando um frasco **BACTEC** 12B tiver uma leitura ≥ 10, volte a incubá-lo e teste diariamente. Consulte a tabela seguinte, que indica quando deve ser executado o teste de sensibilidade.

LEITURA DIÁRIA	ACÇÃO
IC 300 – 499	Incube mais um dia e, em seguida, execute o teste.
IC 500 – 799	Execute o teste no mesmo dia.
IC ≥ 800	Dilua de 1:2 com 1 mL de líquido de diluição; execute o teste.

Se desejar atrasar o teste de sensibilidade, refrigere o frasco 12B. Nesta altura, o teste de sensibilidade deve ser executado no prazo de uma semana.

Prepare um inóculo bacteriano uniforme, retirando meio para uma seringa de utilização única com uma agulha fixa e expelindo novamente o meio para o frasco, várias vezes, sem retirar a agulha do septo do frasco. Este inóculo é utilizado directamente para o teste de sensibilidade ao fármaco.

Cultura em meio sólido: Faça uma suspensão homogénea de várias colónias em meio sólido. A cultura não deve ter mais de 4 a 5 semanas. Ajuste a turvação da suspensão para um padrão no. 1,0 de McFarland, caso esteja a utilizar um plano diário, ou para 0,5, caso esteja a utilizar um plano que não inclua fins-de-semana. Se tiver dúvidas quanto à viabilidade ou idade da cultura, efectue a repicagem para 12B Medium, para obter uma cultura nova.

Inoculação: Disponha os frascos de 12B Medium num suporte e identifique-os correctamente (normalmente, controlo, estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol). Necessitará de um frasco para cada concentração de fármaco e um para o controlo. (Os tabuleiros de transporte em cartão podem ser utilizados como suportes.)

Usando luvas de borracha e trabalhando numa câmara de segurança biológica, inocule 0,1 mL da suspensão bacteriana em cada um dos frascos de **BACTEC** 12B Medium com fármaco. Para esta inoculação, utilize uma seringa de tuberculina com agulha fixa descartável.

Para o frasco de controlo, não inocule a suspensão directamente; primeiro, faça uma diluição de 1:100, transferindo 0,1 mL da suspensão para 9,9 mL de Líquido de diluição especial. Depois de misturar totalmente, invertendo pelo menos 10 vezes, inocule 0,1 mL desta diluição para o frasco de 12B Medium de controlo (sem fármaco).

Com uma compressa de gaze embebida em desinfectante adequado, limpe o topo de cada frasco inoculado e, em seguida, limpe com uma zaragatoa com álcool a 70%. Incube a 37ºC ± 1°C.

Plano de leitura:

Plano de testes diários: Teste os frascos diariamente (incluindo fins-de-semana e feriados), aproximadamente à mesma hora (± 2 h), num instrumento **BACTEC** 460TB, até se obter um IC igual ou superior a 30 no frasco de controlo. Teste durante 4 dias, no mínimo, ou até um máximo de 12 dias. Utilizando este plano de testes, poderá executar um teste de sensibilidade a fármacos em qualquer dia da semana.

Plano que não inclui fins-de-semana: O procedimento é semelhante ao plano de testes diários acima descrito com as seguintes excepções:[7] (a) Agrupe todas as culturas positivas e execute os testes de sensibilidade apenas às sextas-feiras. Siga os procedimentos anteriormente descritos. (b) Se for utilizado um frasco **BACTEC** positivo, consulte a tabela acima.

Inicie os testes dos frascos inoculados às segundas-feiras, omitindo os fins-de-semana. Os frascos devem ser testados, pelo menos, às segundas, terças e quartas-feiras (mínimo de 5 dias desde o dia de inoculação até um máximo de 12 dias), aproximadamente à mesma hora (± 2 h).

Teste directo de sensibilidade a fármacos: Se uma amostra for positiva para AFB num esfregaço, normalmente conterá micobactérias em número suficiente para a execução de um teste de sensibilidade a fármacos no 12B Medium. O procedimento é basicamente o mesmo procedimento indicado para a sensibilidade indirecta. As diferenças entre procedimentos são as seguintes:

Após o processamento da amostra, inocule o meio de cultura e faça um esfregaço para coloração AFB. Refrigere o restante concentrado da amostra.

Observe o esfregaço AFB. Se for positivo com a coloração de Ziehl-Neelsen ou o método de flurocromo, execute o teste de sensibilidade no mesmo dia.

Adicione **BACTEC PANTA** a todos os frascos com fármacos e sem fármacos (controlo). Adicione 0,1 mL de concentrado da amostra bem misturado aos frascos com fármacos. Faça uma diluição do concentrado da amostra de 1:10 e inocule 0,1 mL no frasco de controlo. Incube a 37ºC e teste os frascos no instrumento do Sistema **BACTEC** 460TB com intervalos de 2 a 3 dias, durante um período máximo de 21 dias. Com amostras fortemente positivas em esfregaços, teste diariamente.

Interprete os resultados quando o IC do controlo for igual ou superior a 20. Confirme os resultados com um teste indirecto de sensibilidade. Apresente os resultados logo que a identificação de *M. tuberculosis* tenha sido confirmada por um teste **BACTEC** NAP ou outros testes.

Controlo de qualidade

NÃO UTILIZAR os frascos que tenham ultrapassado o prazo de validade.

NÃO UTILIZAR os frascos que apresentem rachas ou defeitos; eliminar o frasco de forma apropriada.

Com cada S.I.R.E. Drug Kit, são fornecidos Certificados do Controlo de Qualidade. Estes certificados apresentam os microrganismos de teste utilizados para este tipo de produto.

Antes de utilizar os frascos, o utilizador deverá examiná-los relativamente a sinais de deterioração. Os frascos que apresentem turvação, contaminação ou descoloração (escurecimento) não devem ser utilizados. Os frascos de fármacos S.I.R.E. que apresentem humidade (ausência de aspecto aveludado) não devem ser utilizados. O desempenho dos fármacos pode ser verificado, executando testes de sensibilidade com ou mais microrganismos de controlo de qualidade, sempre que executar um teste de sensibilidade.

No. ATCC	Estirpe
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv sensível aos fármacos S.I.R.E.
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente à estreptomicina
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente à isoniazida
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente ao etambutol
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente à rifampicina

A estirpe ATCC 27294 H37Rv deve ser sempre incluída e deve ser sempre sensível. Se esta cultura demonstrar resistência a algum fármaco ou se o controlo do teste de sensibilidade de alguma cultura não crescer (no prazo de 12 dias), não apresente os resultados. Repita o teste.

Como parte do plano de manutenção diário, devem ser executados no instrumento **BACTEC** Frascos de teste do desempenho (**BACTEC** Performance Test Kit). Caso sejam obtidas leituras baixas, mas os Frascos de teste do desempenho tenham apresentado um resultado correcto, poderão existir problemas do instrumento (consulte o folheto informativo do **BACTEC** PTK, PP046JAA).

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação europeus e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as normas do CLSI (anteriormente NCCLS) e os regulamentos da CLIA que dizem respeito a este assunto, para obter orientações sobre práticas de controlo de qualidade apropriadas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando os frascos de controlo atingirem um IC igual ou superior a 30, os resultados devem ser interpretados da seguinte forma: se a ΔIC for menor no frasco do fármaco do que no frasco do controlo, a população é sensível; se for maior, então a população é resistente.

ΔIC (Controlo) > ΔIC (fármaco) – "sensível"

ΔIC (Controlo) < ΔIC (fármaco) – "resistente"

ΔIC (Controlo) ≈ ΔIC (fármaco) – "limiar"

A tabela seguinte apresenta os dados obtidos com o *M. tuberculosis* cultivado em meio sólido e testado com o método de sensibilidade **BACTEC**. Foram obtidos dados idênticos com o *M. tuberculosis* cultivado inicialmente em 12B Medium. No entanto, devido ao menor número de células do inóculo, as leituras iniciais podem ser mais baixas.

Leitura do IC diária					
Dia	Controlo	Estreptomicina	Isoniazida	Rifampicina	Etambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
ΔIC	+41	+2	+250	+2	-9
Resultados	—	Sensível	Resistente	Sensível	Sensível

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

As variações na preparação do inóculo influenciam os resultados do teste de sensibilidade, especialmente devido à presença de aglomerados de grandes dimensões e a uma diluição de 1:100 incorrecta para o frasco de controlo. Se o crescimento do frasco de controlo não for satisfatório, o teste deve ser repetido.

Contaminação

Deverá ter cuidado para evitar a contaminação durante a inoculação no frasco **BACTEC** 12B. Uma amostra contaminada apresentará uma leitura positiva, mas não indicará uma amostra clinicamente relevante. Tal determinação deverá ser efectuada pelo utilizador com base em determinados factores, tais como o tipo de microrganismo isolado, a ocorrência do mesmo microrganismo em múltiplas culturas, a história do doente, as verificações do equipamento apropriadas, etc. A contaminação poderá também resultar de uma manutenção incorrecta das agulhas e tubagem **BACTEC**, limpeza inadequada do septo ou avaria da unidade de aquecimento da agulha **BACTEC** (consulte o TB Hood Operation and Maintenance Manual (Manual de Funcionamento e Operação de TB Hood).

Devido à natureza dos materiais biológicos existentes nos produtos dos meios e à variabilidade inerente ao microrganismo, o utilizador deverá estar informado sobre a potencial variação dos resultados no isolamento de determinados microrganismos.

VALORES ESPERADOS

Com a rifampicina, estreptomicina e isoniazida, verifica-se habitualmente uma diminuição pronunciada do IC no prazo de alguns dias, caso a população seja sensível. Com o etambutol, ocorre normalmente um pequeno aumento inicial no IC antes de os valores de IC começarem a diminuir. A velocidade de diminuição do IC depende da rapidez de acção do fármaco e da sensibilidade da bactéria. Se uma cultura de *M. tuberculosis* possuir uma população mista de microrganismos sensíveis e resistentes, os valores de ΔIC *versus* tempo irão variar dependendo da percentagem da população que é sensível.

Para o teste directo da sensibilidade, o sucesso global e o tempo necessário dependem da positividade do esfregaço. Na literatura, tem sido referida uma média de 10 a 12 dias com boa concordância com os resultados de testes convencionais.[8,9]

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Vários estudos publicados referiram que os resultados obtidos com o método de sensibilidade **BACTEC** foram comparáveis aos do método de proporção convencional (utilizando o meio 7H10/7H11) ou do método de razão da resistência (utilizando o meio de Lowenstein-Jensen à base de ovo).[1,10-15] A exactidão e a reprodutibilidade do método de sensibilidade **BACTEC** foram igualmente avaliadas, tendo os resultados sido muitas vezes alcançados após 4 a 6 dias.[16-20]

Um estudo realizado por Huang *et al.*, que comparou o Sistema **BACTEC** 460TB com o método das proporções, forneceu os seguintes resultados:[21]

Tabela 1. Resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos e índices de desempenho do diagnóstico, conforme determinado pelo sistema BACTEC 460TB, comparado com o método de diluição em ágar, baseado em 47 isolados de *M. tuberculosis*.

	No. de isolados com resultados especificados†				Índices de desempenho do diagnóstico	
Fármaco, método e concentração do fármaco*	Ambos S	Ambos R	Agar S **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** S	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
STR						
BACTEC 2,0 µg/mL	36	9	0	2	100	81,8
INH						
BACTEC 0,1 µg/mL	16	29	1	1	94,1	96,7
RMP						
BACTEC 2,0 µg/mL	30	14	1	2	96,8	87,5
EMB						
BACTEC 2,0 µg/mL	35	2	4	6	89,7	25

*No método de diluição em ágar, os fármacos foram testados nas seguintes concentrações: STR, 2 µg/mL; INH, 0,2 µg/mL; RMP, 1,0 µg/mL e EMB, 5 µg/mL.

†S = sensível; R = resistente.

Um estudo realizado por Bemer *et al.* comparou o sistema **BACTEC** 460TB S.I.R.E. com o sistema **BACTEC MIGIT** 960 S.I.R.E. Foram testas cento e dez estirpes com uma concordância global de 93,5%. Os tempos de resposta situaram-se entre 4,0 e 10,0 dias para o **BACTEC** 460TB S.I.R.E., com uma mediana de 7,0 dias.[22]

Tabela 2. Resultados do teste de sensibilidade a fármacos de estirpes clínicas de *M. tuberculosis*, conforme determinado pelos sistemas BACTEC MGIT 960 E BACTEC 460 TB.†

		No. de resultados que foram:				
Fármaco (conc. em µg/mL)	No. de testes	S em ambos os testes	R no **MGIT** 960; S no 460 TB	S no **MGIT** 960; R no 460 TB	R em ambos os testes	Concordância (%)
INH (0,1)	110	81	4		25	96,4
INH (0,4)	29	5	3		21	89,7
RIF (2,0)	110	92	1		17	99,1
EMB (2,5)	110	93	3	1	13	96,4
EMB (7,5)	17	7	3		7	82,4
STR (2,0)	110	76	9		25	91,8
STR (6,0)	34	12	10		12	70,6
Total de testes	520	366	33	1	120	93,5

†S, sensível; R, resistente.

Um estudo realizado por Bergmann e Woods comparou os fármacos etambutol e estreptomicina do **BACTEC** 460TB S.I.R.E. com o método das proporções. Os resultados são demonstrados na tabela abaixo:[23]

Tabela 3. Resultados iniciais do teste de sensibilidade ao etambutol e à estreptomicina em instrumentos BACTEC e método das proporções (MOP).†

	No. de resultados que foram:		
Fármaco	Sistema **BACTEC**	MOP	No. de isolados
Etambutol	S	S	63
	R	R	8
	S	R	3
Estreptomicina	S	S	59
	R	R	14
	R	S	1

†Abreviaturas: MOP, método das proporções; S. sensível; R, resistente.

Num estudo separado, Bergmann e Woods também estudaram e compararam os fármacos isoniazida e estreptomicina do **BACTEC** 460TB S.I.R.E. com o método das proporções:[24]

Tabela 4. Resultados do teste de sensibilidade resolvidos para isolados clínicos de *M. tuberculosis* através do método das proporções, BACTEC 460 TB.

	No. de isolados com resultados segundo[a]:	
Fármaco e resultado	MOP	**BACTEC** 460 TB
Isoniazida (baixo[b])		
Sensível	16	16
Resistente	4	4
Isoniazida (elevado[c])		
Sensível	19	18
Resistente	1	2
Rifampicina		
Sensível	17	17
Resistente	3	3

[a]MOP, método das proporções.

[b]Baixo, 0,2 µg/mL para o método da proporção e 0,1 µg/mL para o **BACTEC** 460 TB.

[c]Elevado, 1,0 µg/mL para o método da proporção e 0,4 µg/mL para o **BACTEC** 460 TB.

APRESENTAÇÃO

No. de cat.	**Descrição**
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 frascos liofilizados de estreptomicina, 2 frascos liofilizados de isoniazida, 2 frascos liofilizados de rifampicina, 2 frascos liofilizados de etambutol.
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 frasco liofilizado de isoniazida.
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 por caixa.

BIBLIOGRAFIA: Consulte "References" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Importado e Distribuído no Brasil por:
Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda
Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil
CNPJ 21.551.379/0013-31
Serviço de Suporte Tecnico (11) 5185-9961
Registro ANVISA nº 10033430314
Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555 654

BD BACTEC S.I.R.E. Drug Kit

Español

USO PREVISTO

BACTEC S.I.R.E. Drug Kit (equipo de antibióticos **BACTEC** S.I.R.E.) contiene agentes antimicrobianos para el uso por **BACTEC** 12B Medium (medio **BACTEC** 12B) en el análisis de *Mycobacterium tuberculosis*. Se utiliza principalmente con el instrumento **BACTEC** 460TB.

Los antibióticos de **BACTEC** S.I.R.E. (estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol) se recomiendan como aditivos para medio de cultivo **BACTEC** 12B para realizar análisis cualitativos de sensibilidad de *M. tuberculosis* a partir de cultivo.

RESUMEN Y EXPLICACION

El procedimiento **BACTEC** para el análisis de sensibilidad de micobacterias a antibióticos se basa en el mismo principio básico empleado en el método convencional, excepto que se utiliza un medio líquido y, en lugar de realizar el recuento de colonias después de 3 semanas aproximadamente, se controla el crecimiento mediante un sistema radiométrico y se obtienen resultados notificables dentro de los 4 – 12 días. El análisis de sensibilidad de antibiótico **BACTEC** se determina mediante la siguiente versión modificada del método de proporción convencional.[1] La proporción crítica de la resistencia se determina como el 1% para todos los antibióticos antituberculosos. Esto significa que si el 1% o más de la población micobacteriana de prueba es resistente, el cultivo se considera resistente para propósitos de informe de laboratorio. La resistencia se determina comparando la velocidad de crecimiento en el frasco de control y los frascos de medio 12B que contienen el antibiótico de prueba.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El principio básico del ensayo de sensibilidad radiométrico **BACTEC** para micobacterias es similar al utilizado en el procedimiento de aislamiento primario. Cuando se cultivan micobacterias en el medio 7H12 que contiene sustrato ^{14}C, utilizan el sustrato y se produce $^{14}CO_2$. La cantidad de $^{14}CO_2$ detectada refleja la velocidad y la cantidad de crecimiento que ocurre en el frasco y se expresa en términos de índice de crecimiento ("growth index" o GI). Cuando se añade un antibiótico antituberculoso al medio ocurre una supresión de crecimiento si los organismos de prueba son sensibles. Esta supresión puede detectarse por una reducción o un pequeño incremento del índice de crecimiento diario en comparación con el control. Sin embargo, si los organismos son resistentes, se produce una supresión escasa o nula.

Para determinar la proporción de resistencia del 1%, el inóculo bacteriano utilizado en el frasco de control es un centésimo del utilizado en el frasco con el antibiótico. Los frascos con antibiótico y los frascos de control se analizan diariamente después de la inoculación. La velocidad de aumento en el índice de crecimiento o la cantidad de cambio en el transcurso del día anterior, denominada índice de crecimiento delta (Δ), se compara entre el frasco de control y los frascos con los antibióticos. Si el aumento del índice de crecimiento diario en el frasco de antibiótico es igual o mayor que el del frasco de control, los organismos de prueba se consideran resistentes al antibiótico. Para una población sensible, el aumento del índice de crecimiento diario para el control debería ser mayor que el presentado por el frasco con antibiótico. Por ejemplo, si el 1% de la población micobacteriana es resistente a la isoniazida (INH) entonces el 99% de los organismos deberían ser inhibidos por INH y solamente el 1% crecerá en el frasco con antibiótico. La velocidad de crecimiento en el frasco con antibiótico debería ser similar a la velocidad de crecimiento en el frasco de control en el que el inóculo bacteriano original era una centésima del inóculo en el frasco con antibiótico.

REACTIVOS

Antes de realizar el procesamiento, los frascos con antibióticos **BACTEC** S.I.R.E. contienen los siguientes ingredientes reactivos:

Agentes antimicrobianos liofilizados, cada frasco:

Esreptomicina	1,2 mg
Isoniazida	0,02 mg
Rifampicina	0,4 mg
Etambutol	1,5 mg

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Este producto contiene goma natural seca.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar "[2-5] y las directrices del centro.

Se debe examinar cada frasco antes de usarlo para ver si presenta indicios de daño, deterioro o contaminación. NO UTILIZAR ningún frasco que presente indicios de contaminación. Los frascos que muestren indicios de daño deben ser desechados. En raras ocasiones, el cuello del frasco puede estar rajado y puede romperse al quitar el tapón a presión o al manipular el frasco.

Al realizar una toma de muestras con frascos de cultivo de medio 12B positivos para realizar subcultivo, tinción, etc., es necesario liberar el gas que pueda haberse acumulado debido al metabolismo microbiano. En todo momento deben seguirse las técnicas asépticas y los procedimientos establecidos contra riesgos microbiológicos. Los procedimientos deben realizarse en una cabina de seguridad biológica adecuada en una habitación con un sistema de ventilación adecuado conforme a las normas de los CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention).[6] Utilizar una bata, máscara y guantes protectores adecuados al manipular las muestras y los cultivos de posibles agentes patógenos. Seguir las recomendaciones de los CDC y OSHA (U.S. Occupational Health and Safety Administration).

Para reducir a un mínimo la posibilidad de fugas durante la inoculación, usar jeringas de aguja fija o puntas **Luer-Lok** fijadas firmemente.

Las concentraciones de antibiótico utilizadas en los análisis de sensibilidad convencionales pueden variar de un laboratorio a otro. Es muy importante seleccionar una concentración equivalente de un antibiótico de prueba para el análisis de sensibilidad **BACTEC** si se ha de realizar una comparación de los resultados obtenidos mediante los dos métodos.

La adición de una cantidad exacta de un antibiótico de prueba en el medio de cultivo es un paso clave en el análisis de sensibilidad.

Instrucciones para el almacenamiento

Los frascos con antibióticos **BACTEC** S.I.R.E. deben almacenarse en un lugar fresco (2 – 8 °C) y seco, sin luz solar directa. Una vez reconstituidos, los frascos deben almacenarse durante no más de 3 días a 2 – 8 °C o congelados a -20 °C o a una temperatura inferior durante un máximo de seis meses. Congelar en alícuotas pequeñas. No congelar y descongelar repetidas veces. La fecha de caducidad se aplica al frasco liofilizado sin abrir almacenado de la manera recomendada.

EXTRACCION DE MUESTRAS

Se utilizan cultivos puros aislados de crecimiento activo para análisis de sensibilidad. Para obtener los detalles, consular el prospecto del medio 12B (PP116JAA) y el manual de procedimiento y del producto del sistema **BACTEC** 460TB (MA-0029).

PROCEDIMIENTO

Material suministrado: BACTEC S.I.R.E. Drug Kit.

Materiales necesarios pero no suministrados: Medio **BACTEC** 12B, instrumento **BACTEC** 460TB, líquido diluyente **BACTEC**, jeringa de 5 mL, agua destilada / desionizada, jeringa de tuberculina con aguja fija, solución desinfectante, alcohol isopropílico al 70%.

Procedimiento de análisis

Se suministran antibióticos **BACTEC** S.I.R.E. (estreptomicina, isoniazida, rifampicina y etambutol) en forma liofilizada. Se debe cumplir con el procedimiento estándar y las concentraciones de antibióticos. La concentración de antibióticos después de su reconstitución con 5 mL de agua destilada / desionizada estéril, y después de la dilución (según sea lo apropiado) se realiza de la manera siguiente:

Antibiótico	Reconstituido	Factor de dilución	Concentración/mL	Cant. añadida al medio 12B	Concentración final en el medio 12B/mL
Estreptomicina	5 mL	————	240 µg	0,1 mL	6,0 µg
Estreptomicina	5 mL	Dilución 1:3	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Isoniazida	5 mL	————	4 µg	0,1 mL	0,1 µg*
Rifampicina	5 mL	————	80 µg	0,1 mL	2,0 µg*
Etambutol	5 mL	————	300 µg	0,1 mL	7,5 µg
Etambutol	5 mL	Dilución 1:3	100 µg	0,1 mL	2,5 µg*

*Equivalente a las concentraciones críticas recomendadas por los CDC.

Los ejemplos de concentraciones equivalentes de los medios convencionales para antibióticos primarios y secundarios se encuentran en el manual de procedimiento y del producto **BACTEC** 460TB, en la sección IV.

Si se requiere dilución para lograr una concentración de antibiótico deseada (véase la sección anterior), diluir asépticamente en agua destilada / desionizada. Agitar bien.

Preparación del medio de antibiótico: Utilizar una solución de antibiótico preparada recientemente o descongelar un tubo de solución de antibiótico de referencia congelado. Utilizar una jeringa de 1 mL de un solo uso, añadir exactamente 0,1 mL en un frasco de medio **BACTEC** 12B de 4 mL. Utilizar una jeringa diferente para cada antibiótico. Se debe tener cuidado de que la jeringa no contenga burbujas de aire, y la última porción de 0,1 mL de la jeringa no debe utilizarse. Todos los frascos de medio 12B utilizados en la prueba deben analizarse previamente en un instrumento **BACTEC** 460TB para establecer una atmósfera de CO_2 en el frasco y para desechar cualquier frasco con un índice de crecimiento de 20 o más.

Preparación de inóculo bacteriano: Los cultivos de *M. tuberculosis* con crecimiento activo en medio 12B o en medios sólidos se utilizan para definir el análisis de sensibilidad.

Si un frasco de medio 12B **BACTEC** presenta una lectura de ≥10, volver a incubar y analizar diariamente. Consultar la siguiente tabla para determinar cuándo definir un análisis de sensibilidad.

Lectura diaria.	ACCION
GI 300 – 499	Incubar un día más y luego definir la prueba.
GI 500 – 799	Definir la prueba el mismo día.
GI ≥ 800	Realizar una dilución 1:2 con 1 mL de líquido diluyente; definir la prueba.

Si se debe demorar el análisis de sensibilidad, refrigerar el frasco con medio 12B. En este momento se debe definir la prueba de sensibilidad en el plazo de una semana.

Preparar un inóculo bacteriano uniforme introduciendo alternativamente el medio en una jeringa de un solo uso con una jeringa de aguja fija y volviéndolo a expulsar en el frasco varias veces sin retirar la aguja del tapón del frasco. Este inóculo se utiliza directamente para la prueba de sensibilidad a antibióticos.

Cultivo en medio sólido: Realizar una suspensión homogeneizada de varias colonias en el medio sólido. El cultivo no debe ser de más de 4 – 5 semanas de antigüedad. Ajustar la suspensión a un patrón 1,0 de McFarland si se utiliza un cronograma diario y un patrón de 0,5 si se utiliza un cronograma sin tomar en cuenta los fines de semana. Si no se ha determinado claramente la viabilidad o la edad del cultivo, realizar un subcultivo en el medio 12B para obtener un crecimiento reciente.

Inoculación: Colocar los frascos de medio 12B en una gravilla y rotularlos adecuadamente (a menudo como control, estreptomicina, isoniazida, rifampicina, etambutol). Necesitará un frasco para cada concentración de antibiótico y uno para control. (Las bandejas de cartón que vinieron con el producto pueden utilizarse como gradilla.)

Con guantes de goma y trabajando en un gabinete de seguridad biológica, inocular 0,1 mL de la suspensión bacteriana en cada uno de los frascos del medio **BACTEC** 12B con un antibiótico. Utilizar una jeringa con tuberculina desechable con aguja fija para esta inoculación.

Para el frasco de control no inocular la suspensión directamente, sino primero realizar una dilución 1:100 transfiriendo 0,1 mL de la suspensión en 9,9 mL de líquido diluyente especial. Después de mezclar bien, invertir al menos 10 veces, inocular 0,1 mL de esta dilución en el frasco de medio 12B de control (sin un antibiótico).

Pasar sobre la parte superior de cada frasco inoculado una gasa embebida con un desinfectante apropiado, y luego limpiar con una torunda con alcohol al 70%. Incubar a 37 °C ± 1 °C.

Cronograma de lectura:

Cronograma de análisis diario: Realizar el análisis de los frascos diariamente (incluidos fines de semana y festivos) a la misma hora aproximada cada día (± 2 h) en un sistema **BACTEC** 460TB hasta lograr un índice de crecimiento de 30 o más en el frasco de control. Analizar durante un mínimo de 4 días o un máximo de 12 días. Mediante este cronograma de pruebas se puede definir una prueba de sensibilidad de antibióticos en cualquier día de la semana.

Cronograma sin incluir fines de semana: El procedimiento es similar al cronograma de análisis diario que aparece anteriormente, con las siguientes excepciones:[7] (a) Incluir en un lote todos los cultivos positivos y definir las pruebas de sensibilidad solamente los viernes. Seguir los procedimientos descriptos anteriormente. (b) Si se utiliza un frasco **BACTEC** positivo, consultar la tabla anterior.

Iniciar las pruebas de los frascos inoculados un Lunes, omitiendo el fin de semana. Los frascos deben analizarse al menos lunes, martes y miércoles (un mínimo de 5 días desde el día de inoculación hasta un máximo de 12 días) aproximadamente a la misma hora cada día (± 2 h).

Prueba de Sensibilidad de Antibiótico Directa: Si una muestra es positiva a AFB mediante un frotis, por lo general contiene suficientes micobacterias para realizar una prueba de sensibilidad de antibiótico en medio 12B. Este procedimiento es básicamente el mismo que el de la prueba de sensibilidad indirecta. Las diferencias del procedimiento son las siguientes:

Después del procesamiento de muestras, inocular los medios de cultivo y realizar un frotis para tinción AFB. Refrigerar el resto del concentrado de muestra.

Examinar el frotis AFB. Si es positivo con el método de Ziehl-Neelsen o al fluorocromo, definir la prueba de sensibilidad el mismo día.

Añadir **BACTEC PANTA** para todos los frascos con antibiótico y sin antibiótico (control). Añadir 0,1 mL de concentrado de muestra bien mezclada en los frascos con antibiótico. Diluir el concentrado de muestra a 1:10 e inocular 0,1 mL en el frasco de control. Incubar a 37 °C y analizar los frascos en el instrumento de sistema **BACTEC** 460TB cada 2 – 3 días durante un máximo de 21 días. Con muestras de frotis altamente positivas, realizar la prueba diariamente.

Interpretar los resultados cuando se logra un índice de crecimiento de 20 o más. Confirmar los resultados mediante prueba de sensibilidad indirecta. Reseñar los resultados una vez confirmada la identificación de *M. tuberculosis* mediante la prueba **BACTEC** NAP u otras pruebas.

Control de calidad

NO UTILIZAR los frascos después de la fecha de caducidad.

NO UTILIZAR los frascos que muestran indicios de agrietamientos o defectos; desechar el frasco de la forma apropiada.

En cada equipo de antibióticos S.I.R.E. se incluyen certificados de control de calidad. Los certificados de control de calidad muestran los organismos de prueba utilizados para este tipo de producto.

El usuario debe examinar todos los frascos para determinar si presentan deterioro antes de su utilización. Los frascos que muestren turbidez, contaminación o decoloración (oscurecimiento) no deben utilizarse. Los frascos con antibióticos S.I.R.E. que muestren humedad (sin apariencia suave y esponjosa) no deben utilizarse. El rendimiento de los antibióticos puede comprobarse mediante análisis de sensibilidad de uno o más organismos de control de calidad con cada prueba de sensibilidad definida.

ATCC Nº	Cepa
27294	*M. tuberculosis*, H37Rv sensible a antibióticos S.I.R.E.
35820	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente a la estreptomicina
35822	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente a la isoniazida
35837	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente a etambutol
35838	*M. tuberculosis*, H37Rv resistente a la rifampicina

ATCC 27294 H37Rv siempre debe incluirse y debe ser siempre sensible. Si este cultivo muestra resistencia a cualquier antibiótico o si el control de la prueba de sensibilidad de cualquier cultivo no presenta crecimiento (dentro de los 12 días), no informar los resultados. Repetir la prueba.

Dentro del programa diario de mantenimiento, los frascos para pruebas de rendimiento (equipo **BACTEC** para pruebas de rendimiento) deben analizarse en el instrumento **BACTEC**. Si se obtienen lecturas bajas, a pesar de haber analizado los frascos para pruebas de rendimiento según los procedimientos establecidos, esto podría indicar alguna anomalía en el instrumento (véase el prospecto **BACTEC** PTK, PP046JAA).

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, 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 CLSI (antes NCCLS) y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Cuando los frascos de control muestren un índice de crecimiento de 30 o más, los resultados deben interpretarse de la manera siguiente: Si el índice de crecimiento Δ es menor en el frasco de antibiótico que en el de control, la población es sensible; de lo contrario, es resistente.

GI Δ (Control) > GI Δ (antibiótico): "sensible"

GI Δ (Control) < GI Δ (antibiótico): "resistente"

GI Δ (Control) $\approx$ GI Δ (antibiótico): "dudoso"

La tabla siguiente representa los datos obtenidos de *M. tuberculosis* cultivada en medio sólido y analizada con el método de sensibilidad **BACTEC**. Se obtienen datos similares a partir de *M. tuberculosis* cultivada inicialmente en medio 12B. Sin embargo, debido a que hay menos células en el inóculo, las lecturas iniciales pueden ser inferiores.

Valores diarios del GI					
Día	Control	Estreptomicina	Isoniazida	Rifampicina	Etambutol
1	5	40	50	38	76
2	11	20	100	19	100
3	24	12	250	10	100
4	65	14	500	12	91
GI Δ	+41	+2	+250	+2	-9
Resultados	—	Sensible	Resistente	Sensible	Sensible

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Las variaciones en la preparación del inóculo afectan el resultado de las pruebas de sensibilidad, en especial la presencia de grumos grandes y la dilución incorrecta de 1:100 para el frasco de control. Si el crecimiento en el frasco de control no es satisfactorio, debe repetirse la prueba.

Contaminación

Se deben extremar las precauciones para evitar contaminar la muestra durante la inoculación en el frasco **BACTEC** 12B. Una muestra contaminada dará una lectura positiva pero no indicará una muestra clínicamente relevante. El usuario debe tomar tal determinación sobre la base de factores tales como tipo de organismo aislado, presencia del mismo organismo en varios cultivos, historia clínica del paciente, revisión apropiada del equipo, etc. La contaminación también puede ser resultado del mantenimiento inadecuado de las agujas y los tubos **BACTEC**, de una desinfección inadecuada de la membrana o del funcionamiento defectuoso de la unidad de calentamiento de agujas del sistema **BACTEC** (véase el manual de uso y mantenimiento de la campana para tuberculosis).

Debido a la naturaleza de los materiales biológicos en productos de medios y la variabilidad inherente del organismo, el usuario debe estar consciente de posibles los resultados variables en la recuperación de determinados organismos.

VALORES PREVISTOS

Con rifampicina, estreptomicina e isoniazida, por lo general existe una reducción marcada en el índice de crecimiento en el lapso de unos días si la población presenta sensibilidad. Con etambutol, por lo general se produce un pequeño aumento inicial en el índice de crecimiento antes de que comiencen a bajar los valores de índice de crecimiento. La velocidad de la reducción del índice de crecimiento, depende de la velocidad del efecto del antibiótico y la sensibilidad de las bacterias. Si un cultivo de *M. tuberculosis* presenta una población mixta de organismos sensibles y resistentes, los valores de índice de crecimiento Δ con relación al tiempo variarían según el porcentaje de la población sensible.

Para la prueba de sensibilidad directa, los resultados satisfactorios generales y el tiempo necesario para realizar un informe dependen de la positividad del frotis. Se han informado en publicaciones un promedio de 10 – 12 días con una buena concordancia con los resultados de prueba convencionales.[8,9]

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Varios estudios publicados han reseñado que los resultados obtenidos con el método de sensibilidad **BACTEC** han tenido una buena comparación en relación con el método de proporción convencional (que emplea medios 7H10/7H11) o el método de la proporción de resistencia (que utiliza el medio de huevo Lowenstein-Jensen).[1,10-15] La exactitud y la reproducibilidad del método de sensibilidad **BACTEC** también fueron sometidas a evaluación, con resultados que a menudo se lograron dentro de los 4 – 6 días.[16-20]

Un estudio realizado por Huang et al comparó el sistema **BACTEC** 460TB con el método de proporciones y dio los siguientes resultados.[21]

Tabla 1. Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana y los índices de rendimiento de diagnóstico determinados por el sistema BACTEC 460TB, en comparación con el método de dilución en agar, basado en 47 aislados de *M. tuberculosis*.

	Nº de aislados con resultados específicos†				Índice de rendimiento de diagnóstico	
Antibiótico, método concentración de antibiótico*	Ambos S	Ambos R	Agar S **BACTEC** R	Agar R **BACTEC** S	Specificità (%)	Sensibilità (%)
STR						
BACTEC 2,0 µg/mL	36	9	0	2	100	81,8
INH						
BACTEC 0,1 µg/mL	16	29	1	1	94,1	96,7
RMP						
BACTEC 2,0 µg/mL	30	14	1	2	96,8	87,5
EMB						
BACTEC 2,0 µg/mL	35	2	4	6	89,7	25

*En el método de dilución en agar, los antibióticos se analizaron con las siguientes concentraciones: STR, 2 µg/mL; INH, 0,2 µg/mL; RMP, 1,0 µg/mL; and EMB, 5 µg/mL.

†S = sensible; R = resistente.

Un estudio realizado por Bemer et al comparó el sistema **BACTEC** 460TB S.I.R.E. con el sistema **BACTEC MGIT** 960 S.I.R.E. Se analizaron 110 cepas con una concordancia general del 93,5%. Los tiempos de proceso fueron entre 4 y 10 días con el sistema **BACTEC** 460TB S.I.R.E., con un promedio de 7 días.[22]

Tabla 2. Resultados de sensibilidad de antibiótico con las cepas clínicas de *M. tuberculosis* según la determinación mediante el sistema BACTEC MGIT 960 y BACTEC 460TB.†

		Nº de resultados que fueron:				
Antibiótico (concentración en µg/mL)	Nº de pruebas	S por ambas pruebas	R por **MGIT** 960; S por 460TB	S por **MGIT** 960; R por 460TB	R por ambas pruebas	Concordancia (%)
INH (0,1)	110	81	4		25	96,4
INH (0,4)	29	5	3		21	89,7
RIF (2,0)	110	92	1		17	99,1
EMB (2,5)	110	93	3	1	13	96,4
EMB (7,5)	17	7	3		7	82,4
STR (2,0)	110	76	9		25	91,8
STR (6,0)	34	12	10		12	70,6
Total de pruebas	520	366	33	1	120	93,5

†S, sensible; R, resistente.

Un estudio realizado por Bergmann y Woods comparó los antibióticos **BACTEC** 460TB S.I.R.E. etambutol y estreptomicina, con el método de proporciones. Los resultados se muestran en la tabla a continuación:[23]

Tabla 3. Resultados de prueba a etambutol y estreptomicina con el sistema BACTEC, y el método de proporciones.†

	Nº de resultados que fueron:		
Antibiótico	Sistema **BACTEC**	MOP	Cantidad de muestras
Etambutol	S	S	63
	R	R	8
	S	R	3
Estreptomicina	S	S	59
	R	R	14
	R	S	1

†Abreviaturas: MOP, método de proporciones; S, sensible; R, resistente.

En otro estudio, Bergmann y Woods también examinaron los antibióticos **BACTEC** 460TB S.I.R.E. isoniazida y estreptomicina, y los compararon con el método de proporciones.[24]

Tabla 4. Resultados de pruebas de sensibilidad resueltas para los aislados de *M. tuberculosis* mediante el método de proporciones, BACTEC 460TB.

Antibiótico y resultado	Nº de aislados con resultados según[a]: MOP	**BACTEC** 460TB
Isoniazida ([b] bajo)		
Sensible	16	16
Resistente	4	4
Isoniazida ([c] alto)		
Sensible	19	18
Resistente	1	2
Rifampicina		
Sensible	17	17
Resistente	3	3

[a]MOP, método de proporciones.

[b]Bajo, 0,2 µg/mL para el método de proporciones y 0,1 µg/mL para **BACTEC** 460TB.

[c]Alto, 1,0 µg/mL para el método de proporciones y 0,4 µg/mL para **BACTEC** 460TB.

DISPONIBILIDAD

N° de cat.	**Descripción**
442102	**BACTEC** S.I.R.E. Drug Kit, 2 frascos de estreptomicina liofilizada, 2 frascos de rifampicina liofilizada, 2 frascos de etambutol liofilizado.
442146	**BACTEC** Isoniazid, 1 frasco de isoniazida liofiizada.
442004	**BACTEC** 12B Medium, 4 mL, 100 por caja.

BIBLIOGRAFIA: Vedr "References" en el texto en inglés.

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

Use by / Spotřebujte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Използвайте до / A se utiliza până la / Son kullanma tarihi / Upotrebiti do / Использовать до / дейін пайдалануға / Upotrijebiti do /
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
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 = mènesio 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 mesiaca)
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
ÅÅÅÅ-MM-DD / ÅÅÅÅ-MM (MM = slutet på månaden) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârşitul lunii) /
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)

REF

Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo / Каталожен 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 képviselet az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизиран представител в ЕU / Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU

IVD

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

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

LOT

Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargenummer (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)

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 οσηγίες 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 / Consultaţi instrucţiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu

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

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

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