



## VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

### INTENDED USE

The VersaTREK Myco PZA Kit is a rapid qualitative procedure for *in vitro* susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, from culture, to pyrazinamide (PZA). The VersaTREK Myco PZA Kit is used with the VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) and the ESP® Culture System II (ESP).

Appropriate inoculum sources are prepared from a liquid VersaTREK Myco seed bottle.

### SUMMARY AND EXPLANATION

Rapid diagnosis of tuberculosis is important for initiation of appropriate drug therapy and institution of measures to prevent the spread of this highly contagious disease. Delayed treatment, particularly of multiple-drug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) strains, can result in treatment failure and patient mortality.<sup>1</sup> To address these issues, clinical microbiologists are urged to use the most sensitive and rapid diagnostic tests that provide reliable results. Experts at the CDC have made several recommendations regarding Mycobacterial testing, including the use of both a liquid and solid medium for Mycobacterial culture.<sup>2</sup>

For pyrazinamide susceptibility testing of *M. tuberculosis*, the VTI/ESP System combines a liquid culture medium (VersaTREK Myco Broth), a growth supplement (VersaTREK Myco GS), and a specific concentration of pyrazinamide with a detection system that automatically incubates and continuously monitors culture bottles inoculated with isolates of *M. tuberculosis* from a variety of specimen sources. The sponges in the VersaTREK Myco bottles provide a growth support matrix and increase the surface area exposed to headspace oxygen. The technology of the VTI/ESP System is based on the detection of headspace pressure changes within a sealed bottle due to microbial growth. A special algorithm has been developed for detection of very slow growing Mycobacteria.

With the VTI/ESP System, anti-tuberculosis drug PZA can be injected into VersaTREK Myco bottles supplemented with VersaTREK Myco GS. An inoculum of a confirmed culture of *M. tuberculosis* grown from a seed bottle is added to a drug-free control bottle, used as a positive control, and to a test bottle containing PZA. If the organism is susceptible to the drug, delayed or no microbial growth will be detected. If the organism is resistant to PZA, microbial growth will be detected by the generation of a curve exhibiting a downward excursion from the baseline. The time to detection of drug-free bottle determines when a test is complete. The drug used in this system is the primary drug, pyrazinamide, which is hydrated with an acidic rehydration buffer to a specific critical concentration. The purpose of the acidic rehydration buffer is to attain a final pH of 5.9 to 6.0, which optimizes the activity of the PZA drug. The specific drug concentration for this test is 300 µg/ml.

The detection of microbial growth in the VTI/ESP System is based on the sensitive measurement of gas production and/or gas consumption within the headspace of a sealed culture bottle. This information is used to generate a pressure curve for each bottle. An internal algorithm analyzes the information to determine the status of each test sample. When a set of conditions is met, a bottle is flagged as positive. There are approximately 10<sup>6</sup> CFU/ml of Mycobacteria at the time of detection.

### PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Susceptibility testing of *M. tuberculosis* specimens is performed with the VTI/ESP System by inoculating a suspension of organisms into VersaTREK Myco broth bottles that have been supplemented with VersaTREK Myco GS and pyrazinamide. A VersaTREK Connector is attached to each bottle to establish a closed system for monitoring the bottle with the VTI/ESP instrument. A hydrophobic membrane in the VersaTREK Connector prevents aerosolization.

Isolate information is entered into the system computer and the bottles are placed in the instrument for incubation at 35°C under stationary conditions. VTI/ESP System detects Mycobacterial growth by continuously monitoring (every 24 minutes) the rate of consumption of oxygen within the headspace of the culture bottle and reports that growth response with a positive signal. At the end of the specified incubation period, as determined by the drug-free control bottle for each isolate that is tested, the isolate is manually determined to be susceptible or resistant to the drug.

## REAGENTS

The VersaTREK Myco PZA Kit contains two bottles of the lyophilized pyrazinamide drug and four bottles of the acidic PZA Rehydration Buffer. Each drug bottle is to be rehydrated to 25 ml with the acidic rehydration buffer.

## FORMULA UPON REHYDRATION\*

(PRB) Acidic PZA Rehydration Buffer	25 ml
(PZA) Pyrazinamide	0.45% w/v
(SA) Solubilizing Agent	1.25% w/v

\*Adjusted to meet performance criteria

## PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic use.
2. Refer to Material Safety Data Sheets for complete hazard information.
3. WARNING! POTENTIAL INFECTIOUS TEST SPECIMEN. Follow Universal Precautions and institutional policy in handling and disposing of infectious agents.
4. When working with *Mycobacterium tuberculosis* grown in culture, the recommendation is for Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities.<sup>3</sup>
5. The VersaTREK Connector contains a sharp recessed needle that is sterile upon first removing the seal, but is potentially contaminated upon termination of use.  
Follow institutional policy for handling and disposing of biohazard-contaminated devices. (Do not handle in a casual manner. Sterilize prior to disposal. Dispose in an approved sharps container. Do not reuse.)
6. Visually inspect all bottles for contamination, cracks or other signs of deterioration. Do not use bottles that appear turbid or cracked.
7. Use only needle locking syringes.
8. Autoclave all VersaTREK Myco bottles prior to disposal.
9. Rehydrate the lyophilized PZA drug bottles only with the acidic PZA Rehydration Buffer provided in the kit.

## STORAGE

VersaTREK Myco PZA: Store at 2-8°C. Protect from light. Upon rehydration, store at 2-8°C and use within 4 weeks, or freeze at -20°C and use within 3 months. Once thawed, do not refreeze.

## PROCEDURE: SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* USING THE VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

### Materials Provided:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

### Materials Required but Not Provided:

Sterile distilled or deionized water  
Autoclave  
Middlebrook 7H10 or other mycobacterial agar or egg-base medium, for purity checks  
CO<sub>2</sub> incubator, 37°C  
Sterile loops  
Sterile tuberculin syringes with permanently attached needles  
Mycobactericidal disinfectant (e.g. AmphyI™, OMNI™, etc.)  
Alcohol swabs  
Vortex mixer

Biological safety cabinet  
 Microscope  
 Materials for staining slides  
 Quality Control organism: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

### Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Myco Susceptibility Testing

1. Label each VersaTREK Myco culture bottle with identifying information. For PZA testing, 2 bottles will be used per test.
2. Disinfect the culture bottle stoppers with alcohol.
3. Aseptically add 1.0 ml of VersaTREK Myco GS to each culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe.
4. Rehydrate lyophilized PZA by aseptically adding 25 ml acidic PZA Rehydration Buffer to each drug vial. This yields a drug concentration of 4500 µg/ml.
5. Aseptically add 1.0 ml of the drug to each culture bottle by injecting through the septum with a needle and syringe. The final concentration of pyrazinamide is 300 µg/ml. For the drug-free control bottle, add 1 ml of the acidic PZA Rehydration Buffer in place of the drug. Twenty-five tests can be performed from a single vial.

Drug	Concentration of Drug after Reconstitution	Volume added to Myco test bottles	Final Concentration in Test bottles
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

6. The inoculum of a specimen for susceptibility testing must be confirmed as a pure culture of *M. tuberculosis* prior to PZA testing and prepared as follows:

**VersaTREK Myco Seed Bottle** - A 0.5 ml volume of a 1.0 McFarland equivalent created from an agar or liquid source (growth in Middlebrook 7H9 or liquid from a primary detection bottle) is aseptically injected into a VersaTREK Myco culture bottle supplemented with 1.0 ml VersaTREK Myco GS. A sterile VersaTREK Connector is placed on the bottle and the bottle is incubated in the instrument until a positive signal is determined. This seed bottle must be used within 72 hours. Remove the VersaTREK Connector and vortex for 1-2 minutes. Add 0.5 ml of a 1:10 dilution of culture from a positive VersaTREK Myco seed bottle to the appropriate culture bottles containing drug and to the drug-free growth control bottle.

7. Wipe the culture bottles and stoppers with a Mycobactericidal disinfectant.
8. Mix all bottles by inverting several times.
9. Remove the seal from the bottom of a VersaTREK Connector. Press the needle end of the VersaTREK Connector through the culture bottle stopper. NOTE: Do not invert the culture bottle while the connector is on the bottle. Fluid in the needle may interfere with the pressure readings for the bottle.
10. Place the culture bottle with the VersaTREK Connector into the instrument. Refer to the VTI/ESP System Operator's Manual for details on bottle entry.

Loading suggestion: If the sample accession number is "123", give the PZA test bottles accession numbers such as 123PC for the positive growth control, and 123P for pyrazinamide. In this way, all bottles associated with this sample accession number will be able to be searched for and located as a group.

### RESULTS

**For susceptibility testing using the VTI/ESP System, a test isolate is interpreted as being susceptible or resistant to a drug based on a formula. Record the time to detection of the drug-free bottle. This time is used to calculate susceptible or resistant interpretations using the following formula:**

**Susceptible:** No growth, or the time to detection of the drug bottle is greater than three days (rounded to the nearest whole number) of the time to detection of the drug-free control bottle (rounded to nearest whole number).

**Resistant:** Time to detection of drug bottle is within three days (rounded to the nearest whole number) of the time to detection of the drug-free control bottle (rounded to the nearest whole number). Growth after three days of the control bottle should be disregarded because it is not considered to be an indication of resistance.

**All resistant results should be confirmed by an alternate method prior to reporting.**

Bottles that signal positive should be stained for AFB (Acid Fast Bacilli) and subcultured to a Middlebrook 7H10 or 7H11 agar plate, as well as a non-selective agar plate (e.g. Blood Agar) to ensure purity of the specimen. Growth control bottles that signal in less than 2.5 days may indicate the presence of a non-Mycobacterial contaminant whereas control bottles that do not signal within 12 days after being inoculated may be indicative of improper bottle preparation. For either situation, the specimen should be retested.

Mono-resistance to PZA is uncommon, therefore in the event of unexpected resistance results, verify purity and identification of the isolate.

**ALWAYS** review the isolate's graph before reporting. Refer to the Operator's Manual for graph analysis. If graphs for tests that have signaled positive look abnormal, contact TREK Technical Support at 1-800-642-7029.

PZA Result reporting:

Growth of Control bottle	Test Result	Possible cause	Action
< 3 days	-----	Contaminant or too heavy of an inoculum	Repeat test
> 12 days	-----	Nonviable organism or too light inoculum	Repeat test
> 3 days and ≤ 12 days	Susceptible	-----	Valid test; no action
	Resistant	-----	If isolate is resistant, confirm the result and if mono-resistant confirm purity.

## QUALITY CONTROL

A new lot number or shipment of VersaTREK Myco PZA should be tested with the quality control organism *M. tuberculosis* ATCC 27294 (PZA susceptible). Expected results are shown in Table 1. Quality control should be run once each week when susceptibility testing is performed. Observation of the proper results, within 4-15 days, indicates the reagents are ready for use in testing patient isolates.

If proper results are not observed, do not report patient's results. Repeat quality control and any patient isolates affected by the initial quality control failure. If repeat quality control does not perform as expected, do not report patient results. Do not use the product until you have contacted Technical Services.

1. Add 1 ml VersaTREK Myco GS to VersaTREK Myco culture bottles.
2. Rehydrate lyophilized pyrazinamide with acidic PZA Rehydration Buffer as described under "Inoculation of VersaTREK Myco Culture Bottles for Susceptibility Testing (Item 4)."
3. Add 1 ml of drug to each VersaTREK Myco bottle to yield final drug concentrations of pyrazinamide at 300 µg/ml. Add 1.0 ml PZA Rehydration Buffer to the growth control bottle.
4. Add 0.5 ml of a 1:10 dilution of culture from a positive VersaTREK Myco seed bottle to the appropriate culture bottles containing drug and to the drug-free growth control bottle.
5. After observation of expected results, use the remainder of the lot in testing specimens. If expected results are not achieved, contact VersaTREK Technical Support.

TABLE 1 Expected Quality Control Results

Organism	ATCC	Pyrazinamide
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Susceptible

The most common causes of quality control failure are over-inoculation of the PZA test sets and contamination. If repeated false resistance results are obtained, the PZA antibiotic most likely has lost activity. The recommendation is to test with a new antibiotic stock.

### LIMITATIONS

1. The VersaTREK Myco PZA susceptibility test does not interpret the degree of susceptibility of the isolate being tested. It is a qualitative test.
2. The VersaTREK Myco PZA susceptibility test can only be performed on the VTI or ESP instruments. Testing cannot be performed manually.
3. Use only pure cultures of *M. tuberculosis*. The user must confirm the purity of the culture, especially if the result is resistant. Cultures that contain multiple species of Mycobacteria may give erroneous results.
4. Failure to prepare the isolates per the manufacturer's recommendation may lead to inaccurate results.
5. Failure to re-hydrate the PZA with the proper volume of acidic PZA Rehydration Buffer may give inaccurate results.
6. Thorough mixing of inoculated bottles is important. Failure to mix adequately may lead to false resistant results.
7. Failure to use the VersaTREK Myco GS growth supplement may lead to false susceptible results.

### EXPECTED RESULTS

In the initial testing, a total of 96 clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested with the VersaTREK Myco PZA Kit at five geographically diverse sites. The testing included both fresh clinical and sub-cultured isolates from liquid and solid media sources.

The repeat rates for this study was <10%. The average time to result for the VersaTREK Myco PZA susceptibility test was 8.18 days for a liquid seed inoculum, with a range from 3 to 15 days. See figure 1 below.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### In house testing

#### **Lot Reproducibility:**

Lot reproducibility was performed using 4 well-characterized strains of *M. tuberculosis*, which were tested in triplicate and on three separate days. Three lots of VersaTREK Myco broth were represented in the testing. The overall reproducibility was 100% for seeded inoculum.

Eight lots of manufactured VersaTREK Myco PZA, seven VersaTREK Myco broth, and six VersaTREK Myco GS were evaluated for reproducibility with acceptable results for all lots.

#### **CDC Challenge Panel Testing:**

Ten well-characterized strains of *M. tuberculosis* were tested and compared to BACTEC 460TB and to expected results. Eight strains were susceptible and two were resistant to PZA. There was an overall 100% agreement with BACTEC and expected results.

#### **Comparison of ESP Culture System II and VersaTREK Microbial Detection System:**

Recovery of different microorganisms and time to detection was used to demonstrate no difference in performance between ESP Culture System II and VersaTREK Microbial Detection System with additional testing of *M. tuberculosis* and PZA. Results and time to detection by either system were not significantly different.

**Clinical Site testing:**

**Clinical Evaluation:**

The VersaTREK Myco PZA susceptibility test was evaluated at five geographically diverse sites composed of regional reference centers, public health laboratories, and university hospital-based laboratories. The VersaTREK Myco PZA Kit was compared to the BACTEC 460TB PZA susceptibility test method.

**Reproducibility Testing:**

Lot reproducibility was performed using two well-characterized strains of *M. tuberculosis* from CDC using two lots each of VersaTREK Myco broth and VersaTREK Myco GS. Testing was performed in triplicate and on three separate days. The overall reproducibility was  $\geq 95\%$  for seeded inoculum.

**Challenge Testing:**

CDC challenge set of 30 organisms was tested at three sites. Of the possible 90 test points, only 77 were valid. The lower number of tests (7.2% repeat rate) was due to no growth, contamination or instrument issues. Of the 77 organisms tested, 68 were susceptible and 9 were resistant. There was an overall agreement of 98.7% with expected results

**Clinical Isolate Testing using Seed Inocula**

Susceptibility tests of *Mycobacterium tuberculosis* were performed on 96 isolates from a liquid inoculum source.

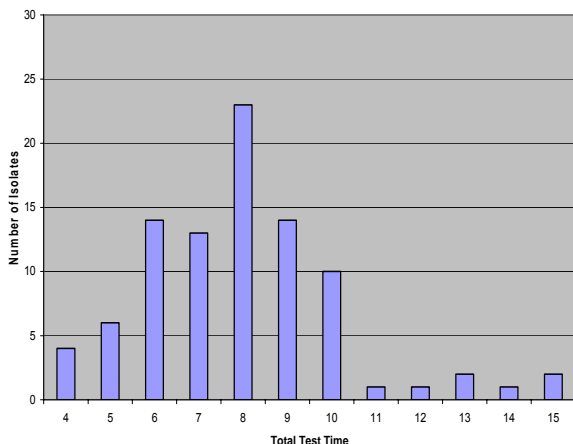
Table 2 presents the results from clinical isolate testing for PZA at 300  $\mu\text{g/ml}$  for ESP and 100 $\mu\text{g/ml}$  for BACTEC. Testing showed 11 discordant results for seeded inoculum. Of the 11 discordant results from seeded inoculum, 10 were resistant for ESP/VTI and susceptible for BACTEC; and one was susceptible for ESP/VTI and resistant for BACTEC.

Table 2. Clinical Isolate Results- VersaTREK Myco PZA susceptibility test compared to BACTEC 460TB susceptibility.

		BACTEC 460TB System		ESP/VTI System			
		Expected Results		Susceptible		Resistant	
Source	# Tests	S	R	# Agree	Category Agreement % (95% CI) <sup>a</sup>	# Agree	Category Agreement % (95% CI)
Liquid	96	83	13	73	88 (79-94.1)	12	92.3 (64-99.8)

a. 95% Confidence Intervals (CI). Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figure 1. Total test time for seeded inoculum preparation for VersaTREK Myco PZA Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*



## HAZARD INFORMATION

### Pyrazinamide

Xn	Harmful
R22	Harmful if swallowed.
S20	When using do not eat or drink.
S36	Wear suitable protective clothing.
S46	If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

## REFERENCES

1. Stratton, C.W. 1992. The resurgence of tuberculosis. *Inf. Dis. Newsl.* 11:73-80.
2. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsberg, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-770.
3. CDC/National Institutes of Health, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Edition Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC and NIH, 1999; DHHS publication no. (CDC) 93-8395.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BACTEC is a trademark of Becton Dickinson and Company

ESP and VersaTREK are trademarks of TREK Diagnostic Systems, Inc.



For additional information call TREK Technical Support at 1.800.642.7029.



TREK Diagnostic Systems  
982 Keynote Circle, Suite 6  
Cleveland, Ohio 44131  
800.871.8909



TREK Diagnostic Systems  
Imberhorne Lane, East Grinstead  
West Sussex, RH19 1QX England

L-TDST015-3  
2006-09

### **APLICACIONES PREVISTAS**

El VersaTREK Myco PZA Kit es un sistema cualitativo rápido, que se emplea para realizar *in vitro* la prueba de sensibilidad a la pirazinamida (PZA) de la *Mycobacterium tuberculosis* a partir de un cultivo. El VersaTREK Myco PZA Kit se utiliza en combinación con el VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) y el ESP® Culture System II (ESP).

Las fuentes de inoculante se preparan a partir de un frasco de material activo líquido VersaTREK Myco.

### **RESUMEN Y DESCRIPCIÓN**

El diagnóstico precoz de la tuberculosis resulta esencial para poder iniciar un tratamiento farmacológico adecuado y poner en práctica una serie de medidas destinadas a evitar la propagación de esta enfermedad altamente contagiosa. El tratamiento tardío, en especial de numerosas cepas de *M. tuberculosis* (MDR-TB) resistentes a los fármacos, puede provocar la ineficacia del tratamiento y el aumento de la tasa de mortalidad en los pacientes.<sup>1</sup> Para hacer frente a esta situación, los microbiólogos clínicos están obligados a utilizar las pruebas de diagnóstico de mayor sensibilidad y rapidez, que al mismo tiempo ofrezcan los resultados más fiables. Los expertos de los CDC (Centros para el Control de Enfermedades de Estados Unidos) han realizado una serie de recomendaciones acerca de los análisis micobacterianos, entre las que se incluye el uso de dos medios: el líquido y el sólido, para los cultivos micobacterianos<sup>2</sup>.

Para realizar la prueba de sensibilidad a la pirazinamida de la *M. tuberculosis*, el sistema VTI/ESP combina un medio de cultivo líquido (VersaTREK Myco Broth), un complemento para el crecimiento (VersaTREK Myco GS) y una concentración específica de pirazinamida, con un sistema de detección que incuba de forma automática y supervisa de forma continuada los frascos de material activo inoculadas con los aislados de *M. tuberculosis*, a partir de una gran variedad de fuentes de muestra. Las esponjas de los frascos de VersaTREK Myco aportan una matriz de soporte para el crecimiento y permiten aumentar la superficie expuesta al oxígeno del espacio libre superior. La tecnología del sistema VTI/ESP se basa en la detección de los cambios a causa del crecimiento microbiano originados en la presión del espacio libre superior del interior de un frasco cerrado herméticamente. Se ha desarrollado un algoritmo especial para la detección de las micobacterias de crecimiento muy lento.

Gracias al sistema VTI/ESP, la PZA, un fármaco empleado en el tratamiento de la tuberculosis, se puede inyectar en los frascos de VersaTREK Myco que lleven incorporado el VersaTREK Myco GS. Se añadirá a un frasco testigo que no incorpore el fármaco, además de a un frasco de prueba que contenga PZA, un inoculante del cultivo confirmado de *M. tuberculosis* que se haya desarrollado en un frasco de material activo. Si el organismo es sensible al fármaco, no se registrará crecimiento microbiano o será retardado. Si el organismo es resistente a la PZA, se detectará el crecimiento microbiano por medio de la generación de una curva con una tendencia descendente a partir de la línea de base. El tiempo empleado en la detección del frasco que no contiene el fármaco servirá para determinar cuándo finalizará el análisis. El fármaco utilizado en este sistema es el fármaco primario, la pirazinamida, cuya hidratación se realiza por medio de una solución amortiguadora ácida hasta alcanzar una concentración específica. El objetivo del uso de esta solución amortiguadora ácida es que el valor del pH final sea de 5,9 o 6,0, un valor que servirá para optimizar la actividad del fármaco PZA. La concentración específica de fármaco para esta prueba es de 300 µg/ml.

La detección del crecimiento microbiano en el sistema VTI/ESP se basa en la medición precisa de la producción o del consumo de gas en el espacio libre superior de un frasco de cultivo cerrado herméticamente. Esta información se utiliza para generar una curva de presión por cada frasco. Por medio de un algoritmo interno se analiza la información para determinar el estado de cada una de las muestras de que consta el análisis. Si se cumplen una serie de condiciones, el frasco se marca como positivo. Se identifican aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ml de micobacterias en el momento de la detección.

### **PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO**

La prueba de sensibilidad de las muestras de *M. tuberculosis* se realiza a través del sistema VTI/ESP, gracias a la inoculación de una suspensión de organismos en los frascos de caldo de cultivo VersaTREK Myco a las que se ha incorporado el VersaTREK Myco GS y la pirazinamida. Se conecta un VersaTREK Connector a cada una de los frascos para establecer un sistema de vigilancia estrecha del frasco por medio del instrumento VTI/ESP. El VersaTREK Connector cuenta con una membrana hidrófoba que evita que se produzca aerosolización.



La información relativa a los aislados se introduce en el ordenador del sistema y los frascos se colocan en el instrumento para someterlos a incubación, a una temperatura de 35 °C, en condiciones estables. El sistema VTI/ESP detecta el crecimiento micobacteriano por medio de la supervisión constante (cada 24 minutos) de la tasa de consumo de oxígeno registrada en el espacio libre superior del frasco de cultivo e informa de la respuesta de crecimiento con una señal positiva. Una vez que finalice el periodo de incubación determinado por los frascos testigo sin fármaco de cada uno de los aislados analizados, se establece de forma manual si el aislado será sensible o resistente a dicho fármaco.

## REACTIVOS

El VersaTREK Myco PZA Kit contiene dos frascos de pirazinamida liofilizada y cuatro frascos de solución rehidratante ácida PZA. Cada frasco del fármaco se rehidrata hasta 25 ml por medio de la solución amortiguadora ácida.

## FÓRMULA TRAS LA HIDRATACIÓN\*

(PRB) Solución amortiguadora rehidratante ácida PZA	25 ml
(PZA) Pirazinamida	0.45% w/v
(SA) Agente solubilizante	1.25% w/v

\*Ajustado para cumplir los criterios de rendimiento.

## PRECAUCIONES

1. Para aplicaciones de diagnóstico in vitro.
2. Consulte las Hojas de Información de Seguridad del Material para obtener información completa sobre los riesgos.
3. ¡ADVERTENCIA! MUESTRA DE PRUEBA POTENCIALMENTE INFECCIOSA. Siga las precauciones universales y la normativa del centro a la hora de manipular y desechar los agentes infecciosos.
4. A la hora de trabajar con la *Mycobacterium tuberculosis* que se ha desarrollado en el cultivo, se recomienda utilizar el Nivel de Bioseguridad 3 en cuanto a manejo, contención, equipamiento e instalaciones.<sup>3</sup>
5. El VersaTREK Connector contiene una aguja embutida y afilada, esterilizada hasta que se retira el precinto pero que se puede contaminar después del uso.

Respete la normativa institucional estipulada para el manejo y la eliminación de los dispositivos contaminados biológicamente. (No manipule los instrumentos de forma despreocupada. Realice una esterilización antes de desechar. Deseche en un contenedor autorizado. No vuelva a utilizar los dispositivos.)

6. Verifique visualmente todos los frascos en busca de contaminación, grietas u otros signos de deterioro. No utilice frascos que estén turbios o dañados.
7. Utilice sólo jeringuillas con bloque de aguja.
8. Esterilice en el autoclave todos los frascos de VersaTREK Myco antes de desecharlos.
9. Rehidrate los frascos de PZA liofilizada mediante la PZA Rehydration Buffer que se incluyen en el kit.

## ALMACENAMIENTO

VersaTREK Myco PZA: Guarde a 2-8°C. Proteja de la luz. Después de la rehidratación, guarde a 2-8°C y use antes de 5 días; si es alícuota, guarde a -20°C y use antes de 3 meses. Una vez descongelado, no lo vuelva a congelar. Store at 2-8 °C.

## PROCEDIMIENTO: PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZANDO EL VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

### Materiales suministrados:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44

**Materiales necesarios pero no suministrados:**

Agua destilada o desionizada estéril  
 Autoclave  
 Middlebrook 7H10 u otro agar micobacteriano o caldo de cultivo basado en huevos  
 Incubadora CO<sub>2</sub>, 37°C  
 Bucles estériles  
 Jeringuillas de tuberculina estériles con agujas permanentemente colocadas  
 Desinfectante micobactericida (ej.: Amphyl™, OMNI™, etc.)  
 Tampones de alcohol  
 Mezclador de vórtice  
 Armazón de seguridad biológica  
 Microscopio  
 Materiales para muestras de tinción  
 Organismo de control de calidad: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

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

1. Etiquete cada una de los frascos de cultivo VersaTREK Myco con una información identificativa. En la prueba de la PZA, se utilizarán dos frascos por prueba.
2. Desinfecte los tapones de los frascos de cultivo con alcohol.
3. Agregue en condiciones asépticas 1,0 ml de VersaTREK Myco GS a cada frasco de cultivo, inyectándolo a través del diafragma con una aguja y una jeringa.
4. Rehidrate el PZA liofilizado, añadiendo en condiciones asépticas 25 ml de PZA Rehydration Buffer a cada una de las ampollas de fármaco. Después de esta operación, la concentración de fármaco será de 4500 µg/ml.
5. Agregue, en condiciones asépticas, 1,0 ml de fármaco a cada frasco de cultivo, inyectándolo a través del diafragma con una aguja y una jeringa. La concentración final de pirazinamida será de 300 µg/ml. En el caso del frasco testigo sin fármaco, añada 1 ml de PZA Rehydration Buffer en lugar del fármaco. Se pueden realizar 25 análisis a partir de una sola ampolla.

Fármaco	Concentración de fármaco tras la reconstitución	Volumen añadido a los frascos de prueba Myco	Concentración final en los frascos de la prueba
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

6. Es necesario comprobar que el inoculante de una muestra para realizar la prueba de sensibilidad sea un cultivo puro de *M. tuberculosis* antes de proceder a la realización de la prueba PZA y prepararlo del siguiente modo:

**Frasco de material activo VersaTREK Myco.** Se inyecta, en condiciones asépticas, un volumen de 0,5 ml de un equivalente de 1,0 de McFarland, creado a partir de un agar o una fuente líquida (desarrollado en un Middlebrook 7H9 o del líquido de un frasco de detección primaria), en un frasco de cultivo VersaTREK Myco al que se ha añadido 1,0 ml de VersaTREK Myco GS. El frasco incorpora un VersaTREK Connector y se incuba en el instrumento hasta que se produce una señal positiva. El frasco de material activo se debe utilizar en un plazo de 72 horas. Retire el VersaTREK Connector y agite en vórtice durante uno a dos minutos. Añada 0,5 ml en una dilución de 1:10 de cultivo procedente de un frasco de material activo VersaTREK Myco con resultado positivo a los frascos de cultivo adecuados que contengan el fármaco y al frasco testigo del crecimiento que no lo contenga.

7. Limpie los frascos de cultivo y los topes con desinfectante micobactericida.
8. Mezcle todos los frascos, invirtiéndolos varias veces.
9. Extraiga la junta de la parte inferior de un VersaTREK Connector. Introduzca el extremo de aguja del VersaTREK Connector a través del tapón del frasco de cultivo. NOTA: no invierta el frasco de cultivo mientras el VersaTREK Connector esté en el frasco. El líquido en la aguja puede interferir en las lecturas de presión del frasco.

10. Coloque el frasco del cultivo en el instrumento con el VersaTREK Connector. Consulte el manual del usuario del sistema VTI/ESP para obtener información adicional sobre la introducción de frascos.

Sugerencias para la operación de carga: Si el número de identificador de prueba es “123”, asigne a los frascos de PZA números de identificación, por ejemplo 123CP, para el control del crecimiento positivo y 123P para la pirazinamida. De este modo, se podrán localizar todas los frascos asociadas a este número de identificador de prueba, así como ubicarlos dentro de un grupo.

## RESULTADOS

**Para realizar la prueba de sensibilidad utilizando el sistema VTI/ESP, se valorará si un aislado de prueba es sensible o resistente al fármaco, a partir de una fórmula. Anote el tiempo de detección del frasco que no contiene fármaco. Este tiempo se utiliza para calcular interpretaciones sensibles o resistentes de acuerdo con la siguiente fórmula:**

**Sensible:** No se detecta crecimiento, o el tiempo de detección del frasco que contiene el fármaco supera en más de tres días (se redondea hasta el número entero más cercano) al tiempo de detección del frasco testigo que no lo contiene (se redondea hasta el número entero más cercano).

**Resistente:** El tiempo de detección del frasco que contiene el fármaco no supera en más de tres días (se redondea hasta el número entero más cercano) al tiempo de detección del frasco testigo que no lo contiene (se redondea hasta el número entero más cercano). Se debe desestimar el crecimiento del frasco testigo una vez transcurridos tres días, ya que no se considera como indicativo de resistencia.

**Todos los resultados resistentes se deberán confirmar a través de un método alternativo antes de la elaboración del informe.**

En los frascos en que se obtenga una señal positiva se debe realizar una tinción de los BAR (bacilo ácido-resistente) y un subcultivo en una placa de agar modelo Middlebrook 7H10 o 7H11, así como en una placa agar no selectiva (por ejemplo: agar sangre) para garantizar la pureza de la muestra. Es posible que los frascos testigo del crecimiento que se señalen en un plazo inferior a 2,5 días indiquen la presencia de un contaminante de origen no microbacteriano, mientras que los que no se señalen en los 12 días siguientes a la inoculación pueden indicar que la preparación de las mismas ha sido inadecuada. Si se da cualquiera de estas situaciones, las muestras se deberán someter a un nuevo análisis.

No es habitual encontrar monoresistencia a la PZA, por tanto, en caso de que se produzcan resultados de resistencia imprevistos, es necesario comprobar la pureza y la identificación del aislado.

Revise **SIEMPRE** la gráfica de los aislados antes de informar acerca de los resultados obtenidos. Consulte el manual de usuario para obtener información adicional acerca del análisis de las gráficas. Si las gráficas de las pruebas que han obtenido un resultado positivo presentan alguna anomalía, póngase en contacto con el Servicio de asistencia técnica de TREK, en el teléfono (en EE.UU.): 1-800-642-7029.

### Informe de resultados de la PZA:

Crecimiento en frasco testigo	Resultado de la prueba	Posible causa	Acción
< 3 días	-----	Presencia de contaminante o cantidad excesiva de inoculante	Repetir la prueba
> 12 días	-----	Organismo no viable o cantidad insuficiente de inoculante	Repetir la prueba
> 3 días y ≤ 12 días	Sensible	-----	Análisis válido; ninguna acción
	Resistente	-----	Si el aislado es resistente, confirme el resultado y, si es monoresistente, confirme su pureza.

## CONTROL DE CALIDAD

Es necesario realizar el análisis con un nuevo número de lote o con una nueva remesa de VersaTREK Myco PZA, utilizando el microorganismo de control de calidad *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensible a la PZA). Los resultados esperados se muestran en el cuadro 1. Es aconsejable realizar el control de calidad semanalmente, cuando se realice la prueba de sensibilidad. Si se obtienen los resultados deseados en un plazo de 4 a 15 días, será indicativo de que los reactivos se pueden empezar a utilizar para realizar análisis en los aislados de los pacientes.

Si no se obtienen resultados adecuados, no informe de los resultados obtenidos en los pacientes. Repita el control sobre aquellos aislados de pacientes que se vieran afectados por el error del control de calidad inicial. Si la repetición del control de calidad no se lleva a cabo según lo previsto, no informe de los resultados obtenidos en los pacientes. No utilice el producto hasta que se ponga en contacto con el Servicio de asistencia técnica.

1. Añada 1 ml de VersaTREK Myco GS a los frascos de cultivo de VersaTREK Myco.
2. Rehidrate la pirazinamida liofilizada con la PZA Rehydratation Buffer, tal y como se describe en el apartado “Inoculación de los frascos de cultivo VersaTREK Myco para la realización de la prueba de sensibilidad (punto 4).”
3. Añada 1 ml de fármaco a cada frasco VersaTREK Myco, de modo que la concentración de pirazinamida se sitúe en 300 µg/ml. Añada 1,0 ml de PZA Rehydratation Buffer al frasco testigo del crecimiento.
4. Añada 0,5 ml en una dilución de 1:10 de cultivo procedente de un frasco de material activo VersaTREK Myco con resultado positivo a los frascos de cultivo adecuados que contengan el fármaco y al frasco testigo del crecimiento que no lo contenga.
5. Después de observar los resultados estimados, utilice el resto del lote para realizar el análisis de las muestras. Si no se obtienen los resultados deseados, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de VersaTREK.

CUADRO 1. Resultados previstos para el control de calidad.

ORGANISMO	ATCC	Pirazinamida
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensible

Las causas más habituales de fracaso del control de calidad son la inoculación en exceso de las partidas de PZA y la contaminación. Si se obtienen en repetidas ocasiones resultados de falsa resistencia, lo más probable es que el antibiótico PZA haya perdido actividad. En ese caso, es aconsejable realizar el análisis con una nueva reserva de antibiótico.

## RESTRICCIONES

1. La prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA no resulta apropiada para interpretar el grado de sensibilidad del aislado sometido a la misma. Se trata de una prueba de carácter cualitativo.
2. La prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA únicamente se podrá realizar por medio de los instrumentos VTI o ESP. No es aconsejable realizarla de forma manual.
3. Utilice únicamente cultivos puros de *M. tuberculosis*. El usuario debe garantizar la pureza del cultivo, en particular si el resultado pone de manifiesto su resistencia. En el caso de los cultivos que contengan múltiples especies de micobacterias, es posible que se obtengan resultados erróneos.
4. Si no se respetan las recomendaciones del fabricante a la hora de preparar los aislados, es posible que se obtengan resultados inexactos.
5. So no se realiza de un modo adecuado la rehidratación de la PZA con el volumen adecuado de PZA Rehydratation Buffer ácida, puede que los resultados obtenidos no sean del todo exactos.

6. Es importante mezclar cuidadosamente los frascos inoculados. Si la mezcla no se realiza del modo adecuado, es posible obtener resultados indicativos de una falsa resistencia.
7. Si no se utiliza correctamente el complemento para el crecimiento VersaTREK Myco GS, es posible que los resultados de sensibilidad estén falseados.

## **RESULTADOS ESPERADOS**

Para el análisis inicial, se analizaron un total de 96 aislados clínicos de *M. tuberculosis* con el VersaTREK Myco PZA Kit, en cinco puntos geográficos distintos. El análisis incluye a los aislados clínicos recién obtenidos y a los aislados de subcultivos procedentes de una fuente líquida o sólida.

La tasa de repetición establecida para este estudio fue del < 10%. El plazo medio para obtener los resultados de la prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA fue de 8,18 días en el caso de un inoculante activo líquido, con unos límites de 3 y 15 días. Véase la figura 1 a continuación.

## **CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO**

### **Análisis interno**

#### **Reproducibilidad de los lotes:**

La reproducibilidad de los lotes se llevó a cabo utilizando 4 cepas perfectamente caracterizadas de *M. tuberculosis*, que fueron analizadas por triplicado en tres días distintos. Tres lotes de caldo de cultivo VersaTREK Myco quedaron representados en el análisis. La reproducibilidad total fue del 100% del inoculante activado.

Se evaluó la reproducibilidad de ocho lotes de VersaTREK Myco PZA manufacturado, de siete de caldos de cultivo VersaTREK Myco y de seis VersaTREK Myco GS, obteniéndose resultados aceptables en todos los casos.

#### **CDC Prueba de provocación en placa:**

Se analizaron diez cepas de *M. tuberculosis* perfectamente caracterizadas y se compararon con las de BACTEC 460TB y con los resultados previstos. Ocho cepas resultaron ser sensibles, y dos resistentes a la PZA. Se produjo una coincidencia total del 100% con BACTEC y con los resultados previstos.

#### **Comparación entre el ESP Culture System II y el VersaTREK Microbial Detection System:**

La recuperación de diferentes microorganismos y el tiempo empleado en la detección se utilizaron para demostrar que no existe ninguna diferencia en el rendimiento obtenido con el ESP Culture System II y el VersaTREK Microbial Detection System con el análisis adicional de la *M. tuberculosis* y la PZA. Los resultados y el tiempo empleado en la detección en el caso de ambos sistemas no resultaron significativamente distintos.

### **Análisis en centros clínicos:**

#### **Evaluación clínica:**

La prueba de sensibilidad VersaTREK Myco PZA fue evaluada en cinco puntos geográficos distintos, compuestos por centros de referencia regionales, laboratorios de salud pública y laboratorios dependientes de hospitales universitarios. Se comparó el VersaTREK Myco PZA Kit con el sistema de análisis BACTEC 460TB PZA.

#### **Análisis de reproducibilidad:**

La reproducibilidad de lotes se llevó a cabo gracias a dos cepas perfectamente caracterizadas de *M. tuberculosis*, procedentes del CDC, y al empleo de dos lotes de caldo de cultivo VersaTREK Myco y otros dos de VersaTREK Myco GS. El análisis se realizó por triplicado en tres días diferentes. La reproducibilidad total fue del  $\geq 95\%$  del inoculante activado.

#### **Prueba de provocación:**

El conjunto del CDC utilizado para la prueba de provocación y compuesto por 30 microorganismos se sometió al análisis en tres lugares distintos. Del total de 90 puntos posibles para la prueba, únicamente 77 se consideraron válidos. La reducción del número de pruebas (tasa de repetición del 7,2%) se debió a la ausencia de crecimiento, a la contaminación o a asuntos relacionados con el instrumental. De los 77 microorganismos sometidos a la prueba, 68 resultaron ser sensibles y 9 resistentes. Se produjo una coincidencia total del 98,7% en función de los resultados previstos.

### Análisis clínico de aislados con uso de inoculantes activos

La prueba de sensibilidad de la *Mycobacterium tuberculosis* se realizó en 96 aislados procedentes de una fuente de inoculante líquida.

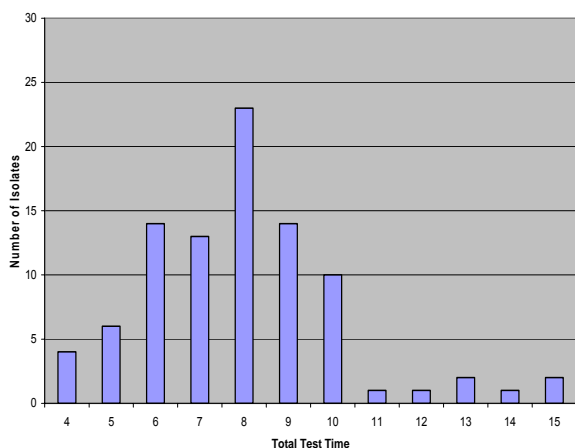
El cuadro 2 muestra los resultados del análisis clínico de aislados con una concentración de PZA de 300 µg/ml en el caso del sistema ESP y de 100 µg/ml en el del sistema BACTEC. Los análisis mostraron 11 resultados discordantes en relación con el inoculante activado. De estos 11 resultados discordantes, 10 eran resistentes a ESP/VTI y sensibles a BACTEC, y uno era sensible a ESP/VTI y resistente a BACTEC.

Cuadro 2. Resultados obtenidos en aislados clínicos Prueba de sensibilidad de VersaTREK Myco PZA en comparación con los de BACTEC 460TB.

Origen	# Pruebas	Sistema BACTEC 460TB		Sistema ESP/VTI			
		Resultados previstos		Sensible		Resistente	
		S	R	# Coincidencia	Coincidencia de las categorías (%) (95% IC) <sup>a</sup>	# Coincidencia	Coincidencia de las categorías (%) (95 % IC)
Líquido	96	83	13	73	88 (79-94,1)	12	92,3 (64-99,8)

a. Intervalos de confianza (IC) del 95%. Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figura 1. Duración total de la prueba para la preparación del inoculante activado para VersaTREK Myco PZA. Prueba de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*



### INFORMACIÓN DE RIESGOS

#### Pirazinamida

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

### BIBLIOGRAFÍA: pg. 7

Para obtener información adicional, llame al Servicio de Asistencia Técnica de TREK al número 1.800.642.7029.

## Italiano

### VersaTREK® MYCO PZA KIT, 7116-70

#### USO PREVISTO

VersaTREK Myco PZA Kit è una tecnica qualitativa rapida per il test di sensibilità *in vitro* alla pirazinamide (PZA) del *Mycobacterium tuberculosis* in coltura. VersaTREK Myco PZA Kit viene utilizzato con VersaTREK Automated Microbial Detection System (VTI) e con ESP® Culture System II (ESP).

Le rispettive sorgenti di inoculo vengono preparate da un flacone di coltura liquida VersaTREK Myco.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Una diagnosi rapida della tubercolosi è importante per l'istituzione della terapia farmacologica adeguata e di misure volte a prevenire la diffusione di questa malattia altamente contagiosa. Un ritardo nell'inizio del trattamento, in particolare di ceppi di *M. tuberculosis* con multiresistenza farmacologica (MDR-TB), può avere come conseguenza l'insuccesso della terapia e la morte del paziente.<sup>1</sup> Per far fronte a questo problema, i microbiologi clinici devono utilizzare i test diagnostici più rapidi e sensibili che forniscano risultati affidabili. Nei test per micobatteri, gli esperti del CDC raccomandano tra l'altro l'uso di terreni sia liquidi sia solidi per la coltura dei micobatteri.<sup>2</sup>

Per il test di sensibilità alla pirazinamide del *M. tuberculosis*, il sistema VTI/ESP combina un terreno di coltura liquido (VersaTREK Myco Broth), un supplemento di crescita (VersaTREK Myco GS) e una specifica concentrazione di pirazinamide con un sistema di rilevamento a incubazione automatica e monitoraggio continuo dei flaconi di coltura, inoculati con isolati di *M. tuberculosis* prelevati da una varietà di sorgenti di campioni. Le spugne nei flaconi VersaTREK Myco offrono una matrice di supporto di crescita e aumentano l'area della superficie esposta all'ossigeno presente nello spazio di testa. La tecnologia del sistema VTI/ESP è basata sul rilevamento di variazioni di pressione nello spazio di testa di un flacone sigillato, dovute alla crescita microbica. Per il rilevamento di micobatteri a crescita molto lenta, è stato realizzato uno speciale algoritmo.

Con il sistema VTI/ESP, è possibile iniettare il farmaco antitubercolare PZA in flaconi VersaTREK Myco integrati con VersaTREK Myco GS. Un inoculo di una coltura confermata di *M. tuberculosis*, cresciuto da un flacone di coltura, viene aggiunto a un flacone di controllo senza farmaco, utilizzato come controllo positivo, e a un flacone test contenente PZA. Se l'organismo è sensibile al farmaco, la crescita microbica sarà assente o ritardata. Se l'organismo è resistente alla PZA, la crescita microbica sarà messa in evidenza dalla comparsa di una curva con andamento verso il basso dalla linea di base. Il tempo di rilevamento del flacone senza farmaco determina il completamento del test. Il farmaco impiegato in questo sistema è quello primario, la pirazinamide, che viene idratata da un tampone di reidratazione acido fino a una concentrazione critica specifica. Il compito di questo tampone è di ottenere un pH finale compreso tra 5,9 e 6,0, che ottimizzi l'attività del farmaco PZA. La concentrazione specifica del farmaco per questo test è di 300 µg/ml.

Il rilevamento della crescita microbica nel sistema VTI/ESP è basato sulla misurazione sensibile della produzione e/o del consumo di gas all'interno dello spazio di testa di un flacone di coltura sigillato. L'informazione ottenuta viene utilizzata per generare una curva di pressione per ciascun flacone. Un algoritmo interno analizza l'informazione per determinare lo stato di ciascun campione del test. Quando un insieme di condizioni viene soddisfatto, un flacone è segnalato come positivo. Al momento del rilevamento, sono presenti ca. 10<sup>6</sup> UFC/ml di micobatteri.

#### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il test di sensibilità di campioni di *M. tuberculosis* viene eseguito con il sistema VTI/ESP inoculando una sospensione di organismi nei flaconi con brodo VersaTREK Myco, integrati con VersaTREK Myco GS e pirazinamide. Un VersaTREK Connector viene collegato a ciascun flacone in modo da creare un sistema chiuso di monitoraggio del flacone con lo strumento VTI/ESP. Una membrana idrofobica nel VersaTREK Connector previene l'aerosolizzazione.

Le informazioni dell'isolato sono inserite nel computer del sistema e i flaconi sono collocati nello strumento per l'incubazione a 35 °C in condizioni stazionarie. Il sistema VTI/ESP rileva la crescita micobatterica mediante il monitoraggio continuo (ogni 24 minuti) della velocità di consumo dell'ossigeno all'interno dello spazio di testa del flacone di coltura e riporta la reazione a tale crescita con un segnale positivo. Al termine del periodo di incubazione specificato, determinato per ciascun isolato analizzato dal flacone di controllo senza antibiotico, viene determinato manualmente se l'isolato è sensibile o resistente all'antibiotico.

## REAGENTI

VersaTREK Myco PZA Kit contiene due flaconi di pirazinamide liofilizzata e quattro flaconi di tampone acido di reidratazione della PZA. Ciascun flacone del farmaco deve essere reidratato a 25 ml con il tampone acido di reidratazione.

## FORMULA IN CASO DI REIDRATAZIONE\*

(PRB) Tampone acido di reidratazione della PZA	25 ml
(PZA) Pirazinamide	0,45% w/v
(SA) Agente solubilizzante	1.25% w/v

\*Regolati per soddisfare i criteri di prestazione.

## PRECAUZIONI

1. Per l'utilizzo diagnostico *In Vitro*.
2. Fare riferimento alla documentazione per la sicurezza dei materiali per informazioni complete sui rischi.
3. AVVERTENZA! CAMPIONE DI PROVA POTENZIALMENTE INFETTIVO. Per la manipolazione e lo smaltimento di agenti infettivi, attenersi alle normative istituzionali.
4. Durante il trattamento del *Mycobacterium tuberculosis* cresciuto in coltura, si raccomanda di attenersi alla prassi, all'equipaggiamento di sicurezza e agli impianti del Livello 3 di biosicurezza.<sup>3</sup>
5. Il VersaTREK Connector contiene un ago rientrante sterile subito dopo la rimozione del sigillo, ma potenzialmente contaminato subito dopo l'utilizzo.

Seguire la politica istituzionale per il trattamento e lo smaltimento di dispositivi contaminati da sostanze biologiche pericolose. (Maneggiare con attenzione. Sterilizzare prima dello smaltimento. Per lo smaltimento, utilizzare appositi contenitori per rifiuti con pericolo di lesione. Non riutilizzare.)

6. Verificare che nessun flacone presenti segni di contaminazione, rottura o altro segno di deterioramento. Non utilizzare flaconi dall'aspetto torbido o con segni di danneggiamento.
7. Utilizzare solo siringhe con sistema di bloccaggio ago.
8. Sterilizzare in autoclave tutti i flaconi di VersaTREK Myco prima dello smaltimento.
9. Reidratare i flaconi con farmaco PZA liofilizzato solo con il PZA Rehydration Buffer acido fornito nel kit.

## CONSERVAZIONE

VersaTREK Myco PZA: Conservare a una temperatura di 2-8°C in luogo protetto dalla luce.

In caso di reidratazione, conservare a 2-8°C ed utilizzare entro 4 settimane, o congelare alla temperatura di -20°C e procedere all'utilizzo entro 3 mesi. Una volta scongelato, non congelare nuovamente.

## PROCEDURA: TEST DI SUSCETTIBILITÀ DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* UTILIZZANDO IL VersaTREK/ESP CULTURE SYSTEM II

### Materiali forniti:

VersaTREK Myco Culture Bottles	7111-42
VersaTREK Myco GS	7112-42
VersaTREK Myco PZA Kit	7116-70
VersaTREK Connectors	7150-44



**Materiali richiesti ma non forniti:**

Acqua distillata o deionizzata sterile.  
 Autoclave  
 Middlebrook 7H10 o altro agar micobatterico o medium a base di uovo.  
 Incubatrice alla CO<sub>2</sub>, a 37°C  
 Anse sterili  
 Siringhe sterili per tuberculina con aghi permanenti  
 Disinfettante micobatterico (cioè, Amphyl™, OMNI™, ecc.)  
 Tamponi imbevuti di alcool  
 Mescolatore vortice  
 Cabina di sicurezza biologica  
 Microscopio  
 Materiali per la colorazione dei vetrini  
 Organismo con Controllo di Qualità: *M. tuberculosis* ATCC® 27294

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

1. Etichettare ciascun flacone di coltura VersaTREK Myco con informazioni di identificazione. Per il test alla PZA, vengono utilizzati 2 flaconi per ciascun test.
2. Disinfettare i tappi dei flaconi di coltura con dell'alcol.
3. Aggiungere in modo asettico 1,0 ml di VersaTREK Myco GS a ciascun flacone di coltura, iniettandolo nel setto con un ago e una siringa.
4. Reidratare la PZA liofilizzata, aggiungendo in modo asettico 25 ml di PZA Rehydration Buffer acido a ciascun flacone di farmaco. Ciò produce una concentrazione di farmaco di 4500 µg/ml.
5. Aggiungere in modo asettico 1,0 ml del farmaco a ciascun flacone di coltura, iniettandolo nel setto con un ago e una siringa. La concentrazione finale di pirazinamide è di 300 µg/ml. Per il flacone di controllo senza farmaco, aggiungere 1 ml di PZA Rehydration Buffer acido al posto del farmaco. Con un unico flacone, è possibile effettuare venticinque test.

Farmaco	Concentrazione di farmaco al termine della ricostituzione	Volume aggiunto ai flaconi test dei micobatteri	Concentrazione finale nei flaconi test
PZA	4500 µg/ml	1 ml	300µg/ml

6. L'inoculo di un campione per i test di sensibilità deve essere confermato come coltura pura del *M. tuberculosis* precedentemente al test alla PZA e preparato nel seguente modo:

**Flacone di coltura VersaTREK Myco** - Un volume di 0,5 ml di un equivalente McFarland da 1,0, creato da una sorgente agar o liquida (crescita in Middlebrook 7H9 o liquido da un flacone di rilevamento primario), è iniettata in modo asettico in un flacone di coltura VersaTREK Myc integrato con 1,0 ml di VersaTREK Myco GS. Un VersaTREK Connector sterile è collocato sul flacone posto in incubazione nello strumento finché non viene determinato un segnale positivo. Il flacone di coltura deve essere utilizzato entro 72 ore. Rimuovere il VersaTREK Connector e il mescolatore vortex per 1-2 minuti. Aggiungere 0,5 ml di una coltura diluita 1:10 prelevata da un flacone di coltura positiva VersaTREK Myco agli appositi flaconi di coltura con farmaco e al flacone di controllo della crescita senza farmaco.

7. Pulire i flaconi di coltura e i tappi con disinfettante micobatterico.
8. Mescolare tutti i flaconi invertendo più volte.
9. Rimuovere il sigillo dal flacone di un VersaTREK Connector. Posizionare l'estremità dell'ago del VersaTREK Connector nel tappo del flacone di coltura. NOTA: Non capovolgere il flacone di coltura mentre VersaTREK Connector si trova sul flacone. Il liquido nell'ago può interferire con le letture della pressione del flacone.

10. Collocare nello strumento il flacone di coltura con il VersaTREK Connector. Per maggiori informazioni sull'inserimento del flacone, consultare il manuale d'uso del sistema VTI/ESP.

Suggerimento per il caricamento: se il numero indicatore del campione è "123", assegnare ai flaconi del test alla PZA numeri indicatori come, ad esempio, 123PC per il controllo positivo di crescita e 123P per la pirazinamide. In questo modo, sarà possibile ricercare e ordinare in un gruppo tutti i flaconi associati a questo numero indicatore del campione.

## RISULTATI

**Per i test di sensibilità che utilizzano il sistema VTI/ESP, l'isolato analizzato viene interpretato come sensibile o resistente a un farmaco in base a una formula. Registrare il tempo di rilevamento del flacone senza farmaco. Questo tempo è impiegato per calcolare interpretazioni di sensibilità o resistenza, utilizzando la seguente formula:**

**Sensibile:** non si è verificata alcuna crescita, oppure il tempo di rilevamento del flacone con farmaco è superiore a tre giorni (arrotondato al numero intero più vicino) del tempo di rilevamento del flacone di controllo senza farmaco (arrotondato al numero intero più vicino).

**Resistente:** il tempo di rilevamento del flacone con farmaco è inferiore a tre giorni (arrotondato al numero intero più vicino) del tempo di rilevamento del flacone di controllo senza farmaco (arrotondato al numero intero più vicino). Ignorare la crescita che si sviluppa dopo tre giorni, poiché non è considerata indicazione di resistenza.

**Confermare tutti i risultati di resistenza mediante un metodo alternativo prima di riportarli.**

I flaconi positivi devono essere trattati per AFB (Acid Fast Bacilli) e sottocolturi su una piastra agar Middlebrook 7H10 o 7H11, e su una piastra agar non selettiva (ad es. agar sangue), per garantire la purezza dei campioni. I flaconi di controllo della crescita che presentano un segnale in meno di 2,5 giorni, possono indicare la presenza di un contaminante non micobatterico, mentre quelli che presentano un segnale entro 12 giorni dall'inoculazione possono indicare una preparazione del flacone non corretta. In entrambi i casi, è necessario ripetere il test dei campioni.

La monoresistenza alla PZA è inconsueta; quindi, in caso di risultati di resistenza non previsti, verificare la purezza e l'identificazione dell'isolato.

Prima di riportare i risultati, riesaminare **SEMPRE** il grafico dell'isolato. Consultare il manuale d'uso per l'analisi dei grafici. Se i grafici dei test positivi sono inconsueti, contattare l'Assistenza tecnica di TREK al numero 1-800-642-7029.

Resoconto dei risultati della PZA:

Crescita del flacone di controllo	Risultati test	Possibile causa	Azione
< 3 giorni	-----	Contaminante o inoculo troppo pesante	Ripetere test
> 12 giorni	-----	Organismo non vitale o inoculo troppo leggero	Ripetere test
> 3 giorni e ≤ 12 giorni	Sensibile	-----	Test valido; nessuna azione
	Resistente	-----	Se l'isolato è resistente, confermare il risultato. Se è monoresistente, confermare la purezza.

## CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario analizzare un nuovo numero di lotto o di spedizione di VersaTREK Myco PZA con l'organismo di controllo qualità *M. tuberculosis* ATCC 27294 (sensibile alla PZA). I risultati previsti sono contenuti nella tabella 1. Effettuare il controllo di qualità una volta alla settimana durante l'esecuzione del test di sensibilità. L'osservazione dei risultati esatti, entro 4-15 giorni, indica che i reagenti sono pronti per essere utilizzati nei test sugli isolati dei pazienti.

Se non si ottengono i risultati esatti, non riportare i risultati dei pazienti. Ripetere il controllo di qualità di tutti gli isolati di pazienti relativi al primo controllo di qualità non riuscito. Se la ripetizione del controllo di qualità non offre i risultati previsti, non riportare i risultati dei pazienti. Non utilizzare il prodotto prima di avere contattato l'Assistenza tecnica.

1. Aggiungere 1 ml di VersaTREK Myco GS ai flaconi di coltura VersaTREK Myco.
2. Reidratare la pirazinamide con PZA Rehydration Buffer acido, come descritto in "Inoculazione dei flaconi di coltura VersaTREK Myco per i test di sensibilità (punto 4)".
3. Aggiungere 1 ml di farmaco a ciascun flacone VersaTREK Myco per ottenere concentrazioni finali di farmaco di 300 µg/ml. Aggiungere 1,0 ml di PZA Rehydration Buffer al flacone di controllo della crescita.
4. Aggiungere 0,5 ml di una coltura diluita 1:10 prelevata da un flacone di coltura positiva VersaTREK Myco agli appositi flaconi di coltura con farmaco e al flacone di controllo della crescita senza farmaco.
5. Al termine dell'osservazione dei risultati previsti, utilizzare il lotto rimanente per analizzare i campioni. Se non sono stati ottenuti i risultati previsti, contattare l'Assistenza tecnica di VersaTREK.

TABELLA 1 Risultati previsti di controllo qualità

Organismo	ATCC	Pirazinamide
<i>M. tuberculosis</i>	27294	Sensibile

Le cause più comuni di un controllo di qualità non riuscito sono l'eccessiva inoculazione del materiale per il test alla PZA e la contaminazione. Se si ottengono risultati di resistenza errati, molto probabilmente l'antibiotico PZA ha perso la sua attività. Si raccomanda di eseguire il test con un altro stock dell'antibiotico.

#### LIMITAZIONI

1. Il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA non identifica il livello di sensibilità dell'isolato esaminato. Si tratta di un test qualitativo.
2. È possibile eseguire il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA solo sugli strumenti VTI o ESP. Non è possibile eseguire il test manualmente.
3. Utilizzare solo colture pure di *M. tuberculosis*. Confermare la purezza della coltura, soprattutto se si ottiene un risultato di resistenza. Le colture che contengono più specie di micobatteri possono dare risultati non esatti.
4. Una preparazione dell'isolato che non rispetti le indicazioni del produttore può portare a risultati imprecisi.
5. La reidratazione della PZA, effettuata senza l'esatto volume del PZA Rehydration Buffer acido, può portare a risultati imprecisi.
6. La miscelazione completa dei flaconi inoculati è importante. Una miscelazione non corretta può portare a risultati di resistenza errati.
7. L'uso non corretto del supplemento di crescita VersaTREK Myco GS può portare a risultati di sensibilità errati.

#### RISULTATI PREVISTI

Nel test iniziale, sono stati analizzati un totale di 96 isolati clinici di *M. tuberculosis* con VersaTREK Myco PZA Kit in laboratori di cinque località diverse. Nel test sono stati inclusi isolati clinici e sottocolturali freschi da sorgenti di terreno liquide e solide.

I tassi di ripetizione in questo studio sono stati <10%. Il tempo medio per il conseguimento dei risultati del test di sensibilità VersaTREK Myco PZA è stato di 8,18 giorni per un inoculo di coltura liquida, con un intervallo da 3 a 15 giorni. Vedere figura 1 di seguito.

## CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

### Test interni

#### **Riproducibilità del lotto:**

La riproducibilità del lotto è stata eseguita utilizzando 4 ceppi di *M. tuberculosis* ben definiti, analizzati tre volte e in tre giorni diversi. Durante il test, sono stati presentati tre lotti di brodo di VersaTREK Myco. La riproducibilità complessiva è stata del 100% per inoculo di coltura.

È stata calcolata la riproducibilità di otto lotti di VersaTREK Myco PZA prodotto, sette brodi VersaTREK Myco e sei VersaTREK Myco GS con risultati accettabili per tutti i lotti.

#### **CDC test Challenge su pannello:**

Dieci ceppi ben definiti di *M. tuberculosis* sono stati analizzati e confrontati con BACTEC 460TB e con i risultati previsti. Otto ceppi erano sensibili e dieci erano resistenti alla PZA. Si è verificata una corrispondenza completa del 100% con BACTEC e con i risultati previsti.

#### **Confronto tra ESP Culture System II e VersaTREK Microbial Detection System:**

Il recupero di diversi microorganismi e il tempo di rilevamento sono stati utilizzati per dimostrare che non esistono differenze tra ESP Culture System II e VersaTREK Microbial Detection System con test aggiuntivo del *M. tuberculosis* e della PZA. I risultati e il tempo di rilevamento dei due sistemi non presentavano differenze significative.

### Test clinico:

#### **Valutazione clinica:**

Il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA è stato valutato nei laboratori di cinque località diverse che comprendono centri di riferimento regionale, laboratori di salute pubblica e laboratori universitari ospedalieri. VersaTREK Myco PZA Kit è stato confrontato con il metodo del test di sensibilità BACTEC 460TB PZA.

#### **Test di riproducibilità:**

La riproducibilità del lotto è stata eseguita utilizzando due ceppi di *M. tuberculosis* ben definiti forniti dal CDC e utilizzando due lotti uno per ciascun brodo di VersaTREK Myco e VersaTREK Myco GS. Il test è stato eseguito tre volte e in tre giorni diversi. La riproducibilità complessiva è stata  $\geq 95\%$  per inoculo di coltura.

#### **Test Challenge:**

Il test CDC è stato svolto su 30 organismi è stato analizzato in tre laboratori. Dei 90 possibili punti del test, solo 77 erano validi. Il numero più basso dei test (tasso di ripetizione 7,2%) non è stato provocato da alcun elemento dello strumento, della contaminazione e della crescita. Dei 77 organismi analizzati, 68 erano sensibili e 9 erano resistenti. La corrispondenza complessiva con i risultati previsti è stata del 98,7%.

#### **Test degli isolati clinici utilizzando inoculi di coltura**

I test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* sono stati eseguiti su 96 isolati prelevati da una sorgente di inoculo liquida.

La tabella 2 presenta i risultati dei test di isolati clinici per la PZA a 300  $\mu\text{g/ml}$  per ESP e a 100 $\mu\text{g/ml}$  per BACTEC. I test hanno presentato 11 risultati discordanti per l'inoculo di coltura. Degli 11 risultati discordanti dall'inoculo di coltura, 10 erano resistenti all'ESP/VTI e sensibili al BACTEC; mentre uno era sensibile all'ESP/VTI e resistente al BACTEC.

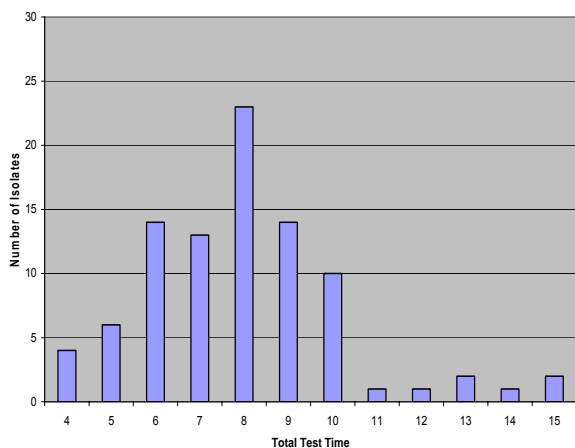
Tabella 2. Risultati degli isolati clinici - Test di sensibilità VersaTREK Myco PZA confrontato con la sensibilità di BACTEC 460TB.

		Sistema BACTEC 460TB		Sistema ESP/VTI			
		Risultati previsti		Sensibile		Resistente	
Sorgente	# Test	S	R	#	Categoria	#	Categoria

				Concorde	Corrispondenza % (95% IC) <sup>a</sup>	Concorde	Corrispondenza % (95% IC) <sup>a</sup>
Liquido	96	83	13	73	88 (79-94,1)	12	92,3 (64-99,8)

a. 95% Intervalli di confidenza(CI). Lee, Eric W. and Dubin, N. Estimation and Sample Size Considerations for Clustered Binary Responses. 1994. Statistics in Medicine. Vol. 13. 1241-1252.

Figura 1. Tempo complessivo del test per la preparazione dell'inoculo di coltura per il test di sensibilità VersaTREK Myco PZA sul *Mycobacterium tuberculosis*



#### INFORMAZIONI SUI RISCHI

##### Pirazinamide

Xn Nocivo

R22 Nocivo per ingestione

S20 Non mangiare né bere durante l'impiego.

S36 Usare indumenti protettivi adatti.

S46 In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI: pg. 7

Per maggiori informazioni, contattare l'Assistenza Tecnica di TREK al numero 1.800.642.7029.