

OPŠTE UPUTSTVO ZA UPOTREBU

Podloge koje su spremne za upotrebu i delimično pripremljene podloge

Ovaj dokument pruža informacije o strukturi **Uputstava za upotrebu** i sadrži dodatne informacije o upotrebi **BD** podloga koje su spremne za upotrebu i delimično pripremljenih podloga.

Dodatne informacije koje nisu pružene u zasebnim Uputstvima za upotrebu date su ovde u okvirima sa tekstom.

Zaglavlje na stranici 1 svakog dokumenta sadrži **oznaku CE** ukoliko je u pitanju **IVD** proizvod usaglašen sa Evropskom IVD direktivom.¹ Takođe su dati i **broj i verzija dokumenta** (npr. PA-123456.01 za podloge u pločicama, a BA-123456.01 za podloge u bocama) i **datum revizije** (mesec i godina). Broj i verzija dokumenta prikazani su i u **podnožju** svake stranice.

Zatim, dat je i **naziv proizvoda**. Neka **Uputstva za upotrebu** sadrže opise nekoliko podloga sa sličnim formulacijama i primenama.

NAMENA

Navedena je oblast primene. Ako se proizvod koristi u druge svrhe, korisnik mora da proceni podlogu ili proceduru.

Kompanija **BD Diagnostic Systems** ne preuzima odgovornost ukoliko se proizvod koristi u svrhe, odnosno za mikroorganizme ili procedure koji nisu preporučeni u **Uputstvima za upotrebu**.

PRINCIPI I OBJAŠNJENJE PROCEDURE

U ovom odeljku je naveden princip date metode („mikrobiološke metode“). Štaviše, objašnjene su informacije o istoriji i razvoju podloge, principima procedure i funkciji sastojaka koji su navedeni u odeljku **REAGENSI**.

REAGENSI

Ovaj odeljak sadrži formulu i pH vrednost proizvoda.

U tabeli formula količine sastojaka [g, mg, µg, mL, IU, U itd.] pomenute su samo jednom, dok se u nastavku teksta pominju samo ako budu promenjene. **Primer** je dat ispod:

BD CHROMagar O157

Formula* po litru prečišćene vode

Hromopepton	22,0 g	
Natrijum-hlorid	5,0	← <i>količina u [g]</i>
Kalijum telurit	2,5 mg	
Cefiksim	0,05	← <i>količina u [mg]</i>
Cefsulodin	4,0	← <i>količina u [mg]</i>
Specijalna hromogena i selektivna mešavina	1,0 g	
Agar	12,0	← <i>količina u [g]</i>

pH vrednost 7,1 +/- 0,2

MERE OPREZA

Ako su označene sa **IVD**, **BD** podloge koje su spremne za upotrebu i delimično pripremljene podloge namenjene su za in vitro dijagnostičku upotrebu, kako je definisano u Evropskoj direktivi za in vitro dijagnostičke uređaje.¹ Takođe se mogu koristiti u drugim oblastima mikrobiologije, kao što je navedeno za svaki pojedinačni proizvod.

Ovi proizvodi namenjeni su samo za profesionalnu upotrebu i sme ih koristiti samo kvalifikovano ili obučeno osoblje. Pacijenti ih ne smeju koristiti za samotestiranje.

Ako su označeni sa „Za laboratorijsku upotrebu“, ovi proizvodi namenjeni su samo za upotrebu u industrijskoj ili opštoj mikrobiologiji, biotehnologiji ili opštoj higijeni i ne smeju se koristiti za obradu ljudskih kliničkih uzoraka.

Ne koristite proizvod koji pokazuje tragove mikrobne kontaminacije, promene boje, sušenja, pucanja ili neke druge znakove kvarenja.

Pridržavajte se procedura za aseptično rukovanje uzorcima i proizvodom pre, tokom i nakon upotrebe.

Biološka i hemijska sigurnost proizvoda

Ovaj odeljak takođe može sadržati informacije o specifičnim biološkim i/ili hemijskim opasnostima, koje su označene odgovarajućim simbolima kao i odgovarajućim rečenicama koje ukazuju na rizik (R) i sigurnost (S).²

Kada su u pitanju rizici koji potiču iz upotrebe životinjskog materijala, ustaljena praksa kompanije **BD** je da takve materijale nabavlja prvenstveno iz Australije, Novog Zelanda i Sjedinjenih Američkih Država. Ni u jednoj od ovih zemalja nema prijavljenih slučajeva BSE-a (goveđe spongiformne encefalopatije) kod domaće stoke. Kompanija **BD** nabavlja materijale životinjskog porekla i iz drugih

zemalja [npr. iz Argentine, Brazila, Kolumbije, Meksika, Južne Afrike i Urugvaja]. Ni u jednoj od tih drugih zemalja nema prijavljenih slučajeva BSE-a (goveđe spongiformne encefalopatije) kod domaće stoke.

Biološka opasnost koja potiče iz uzoraka i mikroorganizama kultivisanih na mikrobiološkim podlogama

Pridržavajte se ustaljenih mera opreza protiv mikrobioloških opasnosti. Uzorcima i kulturama mikroorganizama morate rukovati u skladu sa lokalnim uputstvima i zakonima o biološkoj opasnosti. U skladu sa Evropskom direktivom 2000/54/EC, većina bakterijskih i gljivičnih patogena uvrštena je u drugu rizičnu grupu. Treća rizična grupa** formirana je kako bi obuhvatila vrstu *Salmonella* Typhi, enterohemoragičnu vrstu *Escherichia coli* (EHEC; poznata i kao STEC = *E. coli* koja proizvodi Šiga toksin), vrstu *Shigella dysenteriae* (tip 1) i nekoliko drugih bakterija i gljivica. Pored nekoliko drugih bakterijskih i gljivičnih patogena, u treću rizičnu grupu uvrštene su sve vrste *Brucella*, kao i *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* i *Histoplasma capsulatum*. Za detalje pogledajte Aneks III Direktive 2000/54/EC.³ Toj i ostalim Evropskim direktivama možete direktno pristupiti putem Web lokacije <http://europa.eu.int/eur-lex>

Bacanje proizvoda

Nakon upotrebe, a pre bacanja, kontejneri sa uzorcima i sav kontaminirani materijal, uključujući iskorišćene podloge kultura i kontaminirane kontejnere kultura, moraju se 20 do 30 minuta obrađivati u autoklavu na temperaturi od 121°C ili više (ukoliko se moraju sterilizovati velike količine bačenog materijala) ili spaliti proverenim procedurama.

ČUVANJE I VEK TRAJANJA

BD podloge u pločicama koje su spremne za upotrebu moraju se čuvati na temperaturi od +2 do +8°C. Podloge u bocama i na trakama za testiranje moraju se čuvati na istoj ili različitim temperaturama.

Pored specifičnih **Uputstava za upotrebu**, temperatura čuvanja navedena je i na nalepnici pakovanja ili kutiji proizvoda.

Nemojte zamrzavati ili pregrevati proizvod.

Zamrzavanje može dovesti do potpunog kvarenja agaroznih gelova ili stvaranja taloga na tečnim podlogama. Temperature koje duže vreme premašuju navedenu temperaturu čuvanja mogu dovesti do kvarenja sastojaka podloge. To naročito važi za selektivne agense, kao što su antimikrobi. Preterana vlaga zbog kondenzovane vode može nastati nakon naglih promena novih temperatura (npr. sa 2°C na 25°C i nazad na 2°C) na svim čvrstim podlogama. Podloge u pločicama sa preteranom vlagom moraju se isušiti pre inokulacije, npr. tako što će se sa otvorenim poklopcima staviti u čist inkubator na temperaturi od 30 do 37°C i ostaviti u njemu ne duže od jednog časa. Nemojte u potpunosti isušivati podloge! Tačno vreme držanja u inkubatoru zavisi od vlažnosti vazduha u njemu.

Takođe je navedena i procedura **čuvanja otvorenog pakovanja**. Navedena procedura čuvanja otvorenih kompleta podloga u pločicama odnosi se na čuvanje u frižideru na čistom mestu.

Korisnik mora da izbegava kontaminaciju tokom čuvanja, npr. tako što će spakovati pločice u čiste plastične vreće.

Za čuvanje podloga u bocama iz otvorenih pakovanja važi vek trajanja naveden na nalepnici pakovanja i na bocama ili bočicama pod uslovom da nisu otvarane.

Sve podloge koje su spremne za upotrebu ili delimično pripremljene podloge moraju se čuvati u mraku.

Ako se bilo koja podloga duže vreme izlaže veštačkom osvetljenju, sunčevoj ili ultraljubičastoj svetlosti, njena funkcionalnost može opasti. Nekoliko podloga, kao što su hromogene podloge, endo agar i druge, naročito je osetljivo na jako osvetljenje pre i tokom inkubacije.

Sve **BD** podloge koje su spremne za upotrebu ili delimično pripremljene podloge mogu se koristiti do **isteka roka trajanja** i inkubirati onoliko koliko je preporučeno.

Primeru radi, to važi za inokulaciju mikobakterijske podloge na dan kada joj ističe rok trajanja, nakon čega sledi četiri do šest nedelja inkubacije. Nemojte u potpunosti isušivati podlogu tokom inkubacije. Datum kada ističe rok trajanja (simbol u obliku pešćanog sata) naveden je na pojedinačnim kontejnerima i na nalepnici pakovanja. Na svim proizvodima se koristi format godina-mesec-dan; npr. 2004-06-09 znači 9. jun 2004.

KORISNIČKA KONTROLA KVALITETA

Procedure kontrole kvaliteta navedene u **Uputstvima za upotrebu** treba da sprovede korisnik. Grupe bakterija za testiranje koje su tamo pomenute obično, ali ne i uvek, odgovaraju grupama bakterija koje proizvođač koristi u procedurama kontrole kvaliteta za testiranje pred puštanje u prodaju, koje može obuhvatati dodatne grupe bakterija za provokacione testove. Najčešće se koriste grupe bakterija iz Američke kolekcije uzoraka kultura (= ATCC; **www.atcc.org**), ali koriste se i grupe bakterija iz evropskih kolekcija, npr. iz kolekcije Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; **www.dsmz.de**) ili Nacionalne kolekcije uzoraka kultura (= NCTC; **www.hpacultures.org.uk**).

Pogledajte **Sertifikat o analizi** za datu seriju proizvoda u kome su navedeni baterija prave grupe bakterija za testiranje i rezultati korišćeni za puštanje serije u prodaju.

Procedure za sprovođenje testa mikrobiološke funkcionalnosti mogu zavisi od vrste podloge i metode koja se koristi.

Uvek upotrebljavajte sveže rastvore grupa bakterija za testiranje, pripremljene od kultura koje su prenočile u laboratoriji u odgovarajućim tečnim podlogama (npr. triptički ili **Trypticase** sojin bujon za aerobe i Schaedler bujon sa heminom i vitaminom K za anaerobe). Kao drugo rešenje, možete koristiti sveže rastvore pripremljene od kultura koje su prenočile u laboratoriji na podlogama u pločicama. Trajanje inkubacije za

predkulture mora biti duže ukoliko grupa bakterija za testiranje sporo raste. Za **testiranje nutritivnog svojstva podloge u pločicama** prema CLSI standardu M22 razblažite rastvor inokuluma kako biste dobili 1 do 2×10^4 CFU-a po pločici.⁴ Ukoliko na taj način ne dobijate izolovane kolonije, treba koristiti deset puta svetliji inokulum. Prema standardu DIN EN 12322, svojstva za unapređenje rasta testiraju se koristeći 100 do 1000 CFU-a ili onu količinu CFU-a koja je dovoljna da bi se odgovarajućom tehnikom nanošenja inokuluma na pločicu u brazdama dobile izolovane kolonije.⁵ Ukoliko se grupe bakterija inokulišu tehnikom sa više pločica, za dobijanje uočljivog broja kolonija obično je adekvatno koristiti 50 do 500 CFU-a po pločici. Prema USP i EP uputstvima, morate koristiti 10 do 100 CFU-a po pločici (ili kontejneru).^{6,7}

Za **testiranje inhibitorynog svojstva selektivne podloge u pločicama** prema CLSI standardu M22 za inokulaciju morate koristiti 1 do 2×10^5 , a prema standardu DIN EN 12322 oko 10^4 ili više CFU-a.^{4,5} Inokulumi sa veoma visokom koncentracijom neželjenih grupa bakterija mogu da „preoptereće“ podlogu, što dovodi do „neotkrivenog“ rasta. Poređenja radi, uvek koristite i referentnu podlogu za rast koja treba da bude neselektivna podloga koja obezbeđuje optimalni rast svih grupa bakterija za testiranje. Za ovu namenu pogodni su: za aerobne grupe bakterija Columbia agar sa 5% ovčije krvi, za probirljive grupe bakterija (kao što je *Neisseria gonorrhoeae*) čokoladni agar, za anaerobe Schaedler agar sa vitaminom K i 5% ovčije krvi, a za gljivice Sabouraud glukozni agar. Ako se testiranje vrši kvantitativno, rast „željenih“ grupa bakterija na podlozi za testiranje treba da iznosi bar 70% njihovog rasta na referentnoj podlozi. Na selektivnim podlogama rast „neželjenih“ grupa bakterija mora biti delimično do potpuno inhibiran. Step en inhibicije zavisi od podloge i grupa bakterija za testiranje, ali rast se obično smanjuje faktorom koji iznosi 10^3 do 10^4 (ili više) u odnosu na rast na neselektivnoj referentnoj podlozi za rast.

Za testiranje **funkcionalnosti rasta podloga u bočicama ili bocama** koriste se uporedne metode. Prema CLSI standardu M22-A2, manje epruvete i bočice treba inokulisati koristeći 10^5 cfu-a.⁴ EP, USP i DIN EN 12322 procedure zahtevaju upotrebu istih inokuluma koji su navedeni gore za podloge u pločicama.⁵⁻⁷ Bočice ili boce koje primaju više od 10 mL treba najpre podeliti na alikvote od 5 ili 10 mL u sterilnim epruvetama a zatim testirati na isti način.

Inkubirajte i pregledajte inokulisane podloge na način opisan za dati proizvod.

Odredite **pH** vrednost pomoću potenciometra na sobnoj temperaturi (25°C) kako biste se pridržavali vrednosti navedenih za proizvod. Opseg pH vrednosti koji je dat u **Uputstvima za upotrebu** predstavlja opseg koji je utvrđen po proizvodnji podloge. On može malo varirati tokom veka trajanja i može zavisiti od sistema elektroda koji se koristi.

Sterilnost proizvoda može da testira korisnik tako što će inkubirati nekoliko pločica (ili kontejnera, npr. boca) na pogodnoj temperaturi za inkubaciju (npr. 28 do 35°C) u trajanju od 5 do 7 dana ili koliko bude adekvatno za procedure koje se koriste.^{6,7}

Tečne podloge sa prirodnim zamućenošću treba posle inkubacije tretirati potkulturom i preneti na odgovarajuću čvrstu podlogu (npr. pločice sa **Trypticase** sojinim agarom) kako bi se odredila sterilnost. Pored toga, u slučaju nesigurnosti od koristi mogu biti i bojenje po Gramu i mikroskopija podloga.

PROCEDURA

U odeljku **Obezbeđeni materijal** navedene su podloge i vrsta kontejnera. Većina **BD** podloga u pločicama koje su spremne za upotrebu obezbeđena je u **BD Stacker** posudama od 90 mm, koje su dizajnirane tako da se međusobno zatvaraju kako bi se minimizovala opasnost od kompleta koji bi mogli da iskliznu. Izvesne **BD** podloge u pločicama koje su spremne za upotrebu obezbeđene su u različitim vrstama posuda, kao što su podeljene posude (=posude za dve pločice), kontaktne posude, posude od 150 mm ili pravougaone posude, u zavisnosti od primene.

BD podloge koje su spremne za upotrebu ili delimično pripremljene podloge u bocama ili bočicama dostupne su u puno različitih veličina i zapremina i sa različitim poklopcima u zavisnosti od upotrebe i primene.

Ovde su date informacije o mikrobiološkom stanju proizvoda:

Podloge u pločicama, trake za testiranje i izvesne podloge u bocama ili bočicama aseptično su popunjene; one su „mikrobiološki kontrolisane“. Za te podloge standard DIN EN 12322 dozvoljava stopu kontaminacije od $\leq 5\%$.⁵ Međutim, kriterijumi za interno puštanje u prodaju su stroži. Podloge u bocama koje su sterilisane u svom poslednjem kontejneru označene su simbolom „sterilno“, kao i simbolom „termometar“ (što znači „sterilisano obradom u autoklavu“). Za te podloge važe EP kriterijumi za sterilne proizvode.⁶

U odeljku **Materijal koji nije obezbeđen** navedena je specijalna oprema neophodna za testiranje. Uobičajeni materijal, kao što su inokulacione omče, rasipači, pipetori, inkubatori itd. nije ovde naveden jer je potreban u svakoj mikrobiološkoj laboratoriji.

U odeljku **Tipovi uzoraka** naveden je uzorak(ci) koje treba koristiti sa određenom podlogom. Ukoliko je to neophodno, u odeljku **Prikupljanje i transport** navedeni su specijalni uslovi za prikupljanje i transport uzorka.

Uzorci se moraju prikupljati i transportovati na adekvatan način koristeći odgovarajuće podloge za transport kako bi se izbeglo isušivanje, preterana izloženost kiseoniku ili preterani rast komensalnih organizama. Pored toga, važno je vreme koje treba da prođe od prikupljanja do obrade uzoraka u laboratoriji i ono mora biti što kraće. Za detalje o metodama prikupljanja i transporta za određene patogene treba da pogledate odgovarajuće reference.⁸

U odeljku **Procedura testa** opisane su opšte i konkretne informacije o inokulaciji određene podloge i, ukoliko je to neophodno, upotrebi dodatnih podloga.

Inokulacija podloga

Ustaljena je laboratorijska praksa u mikrobiologiji da se inokulacija podloga uzorkom vrši nanošenjem inokuluma u brazdama kako bi se izolovale kulture, pri čemu se na svakoj pločici primenjuju tri koraka nanošenja u brazdama, a omča ponovo sterilise pre svakog koraka. Ukoliko se koriste unapred sterilisane omče, za svaki korak nanošenja inokuluma u brazdama treba koristiti zasebnu omču. Ukoliko se materijal tretira kulturom direktno iz tupfera, kotrljajte tupfer preko malog dela površine pločice na ivici, a zatim iz te inokulisane oblasti u dva koraka nanosite inokulum u brazdama pomoću omči kako biste izolovali kulture.

Ta tehnika omogućava izolaciju pojedinačnih kolonija iz mešanih kultura. Čiste kulture, dobijene iz pojedinačnih kolonija, obavezne su za identifikaciju i testiranje osetljivosti izolata.

Ovde su takođe pomenuti temperatura i trajanje inkubacije.

Ustaljena je laboratorijska praksa da se redovno kontroliše stvarna **temperatura inkubatora**. Temperature koje su ispod i iznad datog opsega mogu dovesti do gubitka vijabilnosti organizama u kulturama, smanjenog rasta ili neponovljivih rezultata.

Tokom inkubacije podloga u pločicama koje su spremne za upotrebu, obezbedite adekvatan stepen **vlažnosti**, naročito ako inkubacija traje duže vreme. U tom slučaju, ne treba koristiti inkubatore sa protokom vazduha jer se podloge mogu u značajnoj meri isušiti, naročito kada je vlažnost vazduha u laboratoriji mala. Kulture mikroorganizama sa pločica koje su se adaptirale na vlažna okruženja, npr. *Legionella*, moraju se inkubirati u komorama ili posudama povećane vlažnosti. Pločice se takođe mogu zatvoriti lepljivom trakom kako bi se smanjilo isparavanje. Međutim, ipak mora biti omogućena minimalna razmena gasova.

To takođe važi za podloge u epruvetama: navojni poklopci uvek treba da budu blago odvrnuti tokom inkubacije.

U odeljku **Rezultati** pružene su informacije o izgledu organizama na određenoj podlozi. Kada su u pitanju opštenamenske podloge koje se koriste za izolaciju i rast, ove specifične informacije ne mogu biti pružene za sve organizme koji mogu da rastu na podlozi. Treba pogledati odgovarajuće reference.⁹

Na kraju, u odeljku **Izračunavanje i tumačenje rezultata** date su konkretne informacije. Taj odeljak treba potražiti ukoliko dijagnoza zavisi od količine patogena u uzorku. Na primer, to važi za podloge kao što je CLED agar koje se koriste za brojanje bakterija u urinu.

FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE I OGRANIČENJA PROCEDURE

Razmotreno je funkcionisanje podloge i, ukoliko je to primenljivo, navedeni su tipovi organizama koji se mogu izolovati pomoću date podloge, kao i izvori dokaza. Za nove podloge ili podloge koje se odnedavno koriste ovde mogu biti navedeni rezultati dobijeni evaluacijama funkcionalnosti.

Mora se naglasiti da se svi potencijalno značajni organizmi u uzorku vrlo retko mogu otkriti pomoću samo jedne podloge. Pored toga, u jednoj mikrobnoj populaciji mogu postojati pojedinačne grupe bakterija koje ne rastu adekvatno na određenoj podlozi iako je ta podloga pogodna za otkrivanje većine drugih grupa bakterija iz te vrste. Iz tog razloga se za većinu uzoraka istovremeno inokulišu dve ili tri različite podloge, neselektivna podloga kombinuje sa jednom

ili dve selektivne podloge ili se upotrebljavaju dve selektivne podloge sa različitim stepenom selektivnosti.

Pored toga, ovde su pomenuta i konkretna poznata **ograničenja u primeni** podloge. Za većinu podloga je neophodno dalje testiranje kako bi se dobila konačna identifikacija izolovanih organizama.

REFERENCE

Ovde je navedena literatura koja je citirana u dokumentu.

PAKOVANJE/DOSTUPNOST

Ovde su pomenuti dostupni **kataloški brojevi**, **veličine pakovanja** i, ukoliko je to primenljivo, različiti formati.

DODATNE INFORMACIJE

Ovde su date dodatne informacije, uključujući adresu proizvođača (simbol za „fabriku“). Na kraju, navedeni su zaštitni znaci pomenuti u specifičnim dokumentima.

REFERENCE CITIRANE U OVIM OPŠTIM UPUTSTVIMA ZA UPOTREBU

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001 - 0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001 – 0098.
3. 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 98/391/EEC). Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021-0045.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. Search for latest version at www.clsi.org
5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. Search for latest version at www.pheur.org
7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. Search for latest version at www.uspnf.com
8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

© 2009 Becton, Dickinson and Company