VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ
Částečně hotová média a média k okamžitému použití

Tento dokument obsahuje informace o struktuře dokumentů **Pokyny k použití** a doplňující informace o použití částečně hotových médií a médií k okamžitému použití **BD™**.

Doplňující informace, které nejsou uvedeny v jednotlivých dokumentech obsahujících pokyny k použití, jsou uvedeny zde v rámečcích.

Záhlaví na straně 1 u všech dokumentů obsahuje **značku CE** v případě, že produkt je IVD v souladu s evropskou směrnicí IVD[1] Dále je pak uvedeno **číslo dokumentu a *verze*** (například PA-**123456**.***01*** pro média na miskách a BA-**123456**.***01*** pro média v lahvičkách) a **datum revize** (měsíc a rok). Číslo dokumentu a verze jsou opakovaně uváděny v **zápatí** každé strany.

Dále je uveden **název výrobku**. Některé dokumenty obsahující **Pokyny k použití** uvádějí popisy některých médií s podobným složením a určením.

ÚČEL POUŽITÍ
Zde je uvedena oblast určení použití produktu. Rozhodnutí použít médium nebo postup pro jiné účely musí provést uživatel.

Společnost **BD** Diagnostic Systems nenese odpovědnost za případy, kdy je výrobek používán pro účely, mikroorganismy nebo postupy, které nejsou doporučeny v **Pokynech k použití**.

ZÁSADY A VYSVĚTLENÍ POSTUPU
V této části je popsán princip metody („Mikrobiologická metoda“). Dále je zde vysvětlena historie a vývoj média, zásady postupu a funkce jednotlivých složek uvedených v části **REAGENTY.**

REAGENTY
V této části je uvedeno složení a pH výrobku.

V tabulce formule je množství jednotlivých složek [g, mg, µg, ml, IU, U, atd.] uvedeno pouze jednou, a to pouze v případě, že byly změněny. Níže uvádíme **příklad**:

BD CHROMagar™ O157
Formule* na litr deionizované vody:

Chromopepton	22,0 g	
Chlorid sodný	5,0	← ***množství v [g]***
Telluričitan draselný	2,5 mg	
Cefixim	0,05	← ***množství v [mg]***
Cefsulodin	4,0	← ***množství v [mg]***
Speciální chromogenní a selektivní směs	1,0 g	
Agar	12,0	← ***množství v [g]***
pH: 7,1 +/- 0,2		

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Pokud jsou média k okamžitému použití nebo částečně hotová média **BD** označena značkou IVD, jsou určena k diagnostickému použití in vitro tak, jak uvádí evropská směrnice pro diagnostické přístroje in vitro.[1] Lze je také použít v jiných oblastech mikrobiologie, jak je uvedeno pro příslušný produkt.
Tyto produkty jsou určeny pouze pro profesionální použití a smí je používat jen kvalifikovaný a vyškolený personál. Testy nesmí provádět samotný pacient.
Pokud je výrobek označen nápisem „Pro laboratorní použití", je určen k použití pouze v průmyslové nebo obecné mikrobiologii, biotechnologii nebo obecné hygieně a nesmí být používán ke zpracování lidských klinických vzorků.

Nepoužívejte výrobek, pokud jeví známky mikrobiální kontaminace, změny barvy, vysušení, popraskání nebo jiné známky opotřebení.

Před použitím, během něj i po něm postupujte při manipulaci se vzorky a produktem asepticky.

Biologická a chemická bezpečnost výrobku
Tato část obsahuje také informace o specifických biologických a/nebo chemických rizicích, označených odpovídajícími symboly, spolu s odpovídajícími rizikovými (R) a bezpečnostními (S) výstrahami.[2]

Co se týče rizik vyplývajících z použití materiálu zvířecí provenience, společnost **BD** je zavázána odebírat tyto materiály primárně z Austrálie, Nového Zélandu a Spojených států. Žádná z těchto zemí neohlásila případ BSE (bovinní spongioformní encefalopatie) u místního dobytka. Společnost **BD** odebírá materiál zvířecí provenience také z jiných zemí (například z Argentiny, Brazílie, Kolumbie, Mexika, Jihoafrické republiky a Uruguaye). Žádná z těchto zemí neohlásila případ BSE u místního dobytka.

Riziko pocházející ze vzorků a mikroorganismů kultivovaných na mikrobiologických médiích
Dodržujte uvedená bezpečnostní opatření proti mikrobiologickým rizikům. Se vzorky a kulturami mikroorganismů je nutno zacházet podle místních předpisů a právních nařízení vztahujících se k biologickým rizikům. Podle evropské směrnice 2000/54/EC je většina patogenů z řádu bakterií a hub zařazena do rizikové skupiny 2. Riziková skupina 3** byla vytvořena pro zařazení druhů *Salmonella* Typhi, enterohemoragických kmenů *Escherichia coli* (EHEC; uváděná také jako STEC = Shiga toxin produkující *E. coli*), *Shigella dysenteriae* (typ 1) a mnohých dalších bakterií a hub. Z dalších patogenů z řádu bakterií a hub jsou *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. ulcerans,* a *Histoplasma capsulatum* zařazeny do rizikové skupiny 3. Podrobnější informace naleznete v příloze III směrnice 2000/54/EC.[3] Tato a další evropské směrnice jsou k dispozici přímo na webové adrese **www.europa.eu/index.htm**.

Likvidace výrobku
Po použití musejí být nádoby se vzorky a veškeré kontaminované materiály včetně použitých kultivačních médií a kontaminovaných kultivačních nádob ještě před likvidací buď sterilizovány v autoklávu po dobu 20 až 30 minut při teplotě 121° C nebo vyšší (pokud je sterilizováno větší množství likvidovaného materiálu), nebo spáleny podle schválených postupů.

SKLADOVÁNÍ A ŽIVOTNOST

Média **BD** na miskách k okamžitému použití je nutno skladovat při teplotě +2 až +8°C. Média v lahvičkách a na ponorných podložních sklíčkách je nutno skladovat při stejných nebo jiných skladovacích teplotách.

> Vedle specifického dokumentu obsahujícího **Pokyny k použití** je skladovací teplota uvedena na štítku balení nebo na krabičce výrobku.

Chraňte před mrazem a přehřátím.

> Zmrazení může mít za následek úplné opotřebení agarového gelu nebo precipitaci v tekutých médiích. Teploty překračující uvedené skladovací teploty na delší dobu mohou mít za následek úplné poškození složek médií. To platí především pro selektivní přípravky, například antimikrobiální látky.
> V důsledku extrémních změn teploty (například ze 2°C na 25°C a zpět na 2°C) se může na všech pevných médiích vyvinout přílišná vlhkost způsobená srážením vody.
> Média na miskách s přílišnou vlhkostí je nutno před inokulací vysušit, například umístěním s otevřenými víčky do čistého inkubátoru s teplotou 30 až 37°C na dobu maximálně jedné hodiny. Nevysušujte média! Přesný čas působení závisí na relativní vlhkosti v inkubátoru.

Jsou zde uvedeny také podmínky **skladování otevřených balení**. Otevřená balení misek s médii je nutno skladovat na chladném a čistém místě.

> Uživatel musí zamezit kontaminaci během skladování například zabalením misek do čistých plastikových pytlů.

Skladování médií v lahvičkách z otevřených balení: trvanlivost uvedená na štítku balení a na lahvičkách platí, pokud nebyly otevřeny.

Všechna média k okamžitému použití nebo částečně hotová média je nutno skladovat v temnu.

> Při dlouhodobém vystavení umělému osvětlení, slunečnímu světlu nebo UV záření se může účinnost média snížit. Mnohá média (například chromogenní média, agar Endo aj.) jsou výrazně citlivá na silné osvětlení před inkubací i během ní.

Všechna média **BD** k okamžitému použití i částečně hotová média **BD** smějí být použita do uplynutí data expirace a inkubována po doporučenou dobu inkubace.

> To například ještě zahrnuje inokulaci mykobakteriálního média v den expirace, po němž následuje čtyř- nebo šestitýdenní inkubace. Zabraňte vyschnutí půdy během inkubace.
> Datum expirace (symbol přesýpacích hodin) je vyznačeno na jednotlivých nádobách a na štítku balení. Datum na všech výrobcích je uvedeno ve formátu rok-měsíc-den (například 2004-06-09 znamená 9. červen 2004).

KONTROLA KVALITY UŽIVATELEM

Kontrolu kvality, jejíž postup je uveden v **Pokynech k použití,** by měl provádět uživatel. Zde uvedené testovací kmeny většinou (nikoli však vždy) odpovídají kmenům, jež ke kontrole kvality před výdejem šarže používá výrobce a jež mohou zahrnovat doplňující provokační kmeny. Většinou jsou používány kmeny z Americké databáze typových kultur (American Type Culture Collection, ATCC™; **www.atcc.org**), ale používají se také kmeny z evropských databází, například z Německé databáze mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen, DSM; **www.dsmz.de**) nebo z Národní databáze typových kultur (National Collection of Type Cultures, NCTC; **www.hpacultures.org.uk**).

Skutečnou skupinu kmenů a výsledky použité pro výdej šarže naleznete v **certifikátu analýzy** příslušné šarže daného výrobku.

Postupy pro provedení testu mikrobiologické účinnosti mohou záviset na typu média a použité metodě.

Vždy používejte čerstvé suspenze kmenů připravené z kultur namnožených přes noc v odpovídajícím tekutém médiu (například sójové živné půdě Tryptic nebo **Trypticase**™ pro aerobní organismy a živné půdě Schaedler s heminem a vitaminem K pro anaerobní organismy). Lze také použít čerstvou suspenzi připravenou z kultur namnožených přes noc v misce s médiem. Pokud se kmen množí pomalu, je nutno inkubační doby prvokultur prodloužit.
K **testování nutriční kapacity média na misce** podle normy CLSI M22 zřeďte suspenzi inokula tak, aby výsledkem bylo 1 až 2 x 10^4 CFU na misku.[4] Pokud toto zředění neposkytne izolované kolonie, je třeba použít inokulum desetkrát slabší. Dle DIN EN 12322 se vlastnosti podporující množení testují při 100 až 1000 CFU nebo dostatečném množství CFU, při němž se tvoří izolované kolonie při použití techniky rozetření na misku.[5] Pokud jsou kmeny inokulovány kvantitativní technikou, uvádí se 50 až 500 CFU na misku k získání počitatelného množství kolonií. Podle pokynů USP a EP je nutno použít 10 až 100 CFU na misku (nebo nádobu).[6,7]

K **testování inhibiční kapacity selektivních médií na miskách** podle normy CLSI M22 je nutno pro inokulaci použít misku s 1 až 2 x 10^5 CFU a asi 10^4 nebo více CFU dle DIN EN 12322.[4,5] Velmi vysoká inokula nechtěných kmenů mohou „přeplnit“ médium, což vede k „vedlejšímu“ množení.
Ke srovnání vždy používejte referenční růstové médium; mělo by to být neselektivní médium, které umožňuje optimální množení všech testovaných kmenů. K tomuto účelu je pro aerobní kmeny vhodný agar Columbia s 5 % ovčí krve, pro náročné kmeny (například *Neisseria gonorrhoeae*) čokoládový agar, pro anaerobní kmeny agar Schaedler s vitaminem K a 5 % ovčí krve a pro houby glukózový agar Sabouraud. Při kvantitativním testu by mělo být množení „požadovaných“ kmenů na testovacím médiu alespoň 70% v porovnání s referenčním médiem. Na selektivních médiích musí být množení nežádoucích kmenů částečně až úplně utlumeno. Stupeň inhibice závisí na médiu a na kmenech, ale růst je většinou potlačen faktorem 10^3 až 10^4 (nebo vyšším) ve srovnání s množením na neselektivním růstovém referenčním médiu.

K testování **růstové účinnosti médií v lahvičkách** se používají srovnatelné metody. Menší zkumavky a lahvičky by měly být inokulovány na 10^5 CFU podle normy CLSI M22.[4] K postupům EP, USP a DIN EN 12322 jsou zapotřebí stejná inokula jako pro média na miskách (viz výše).[5-7] Lahvičky s plnými objemy nad 10 mL je třeba nejprve rozdělit na dávky 5 nebo 10 mL do sterilních zkumavek a testovat stejným způsobem.

Inkubujte a zkontrolujte inokulovaná média podle postupu popsaného pro daný produkt.

Při pokojové teplotě (25° C) změřte **pH**, zda odpovídají hodnotám určeným pro tento výrobek. Rozsah hodnot pH uvedený v **Pokynech k použití** odpovídá hodnotám naměřeným po výrobě média. Může se mírně lišit po datu životnosti a může záviset na používaném systému elektrod.

Sterilitu tohoto výrobku může uživatel testovat inkubací několika misek (nebo nádob, například lahví) při vhodné inkubační teplotě (například 28 až 35° C) po dobu 5 až 7 dní nebo jiným způsobem podle toho, jaký postup pak bude použit.[6,7]

U tekutých, přirozeně zakalených médií by se měla po inkubaci provést subkultivace na vhodném pevném médiu (například na miskách se sójovým agarem **Trypticase™**), aby bylo možné potvrdit sterilitu. Ve sporných případech je vhodné také Gramovo barvení a mikroskopie média.

POSTUP

V kapitole **Dodávaný materiál** jsou uvedena média a typ nádoby. Většina médií **BD** na miskách pro okamžité použití se dodává v 90mm miskách **BD Stacker™**, které do sebe zapadají, aby se snížilo riziko sklouznutí. Některá média **BD** na miskách pro okamžité použití se dodávají v jiných typech misek, například v rozdělených miskách (dvoumiskách), kontaktních miskách, 150mm miskách nebo hranatých miskách, v závislosti na jejich použití.
Média **BD** pro okamžité použití nebo částečně hotová média v lahvích či lahvičkách jsou k dispozici v různých velikostech, objemech plnění a s různými uzávěry, v závislosti na jejich použití.
Zde jsou uvedeny informace o mikrobiologickém stavu výrobku:

Média na miskách, ponorná podložní sklíčka a různá média v lahvích nebo lahvičkách jsou plněna asepticky; podléhají „mikrobiologické kontrole“. Pro tato média je dle normy DIN EN 12322 povolena úroveň kontaminace ≤ 5 %.[5]
Interní kritéria pro výdej jsou však přísnější.
Média v lahvích, která jsou sterilizována v konečných nádobách, jsou opatřena štítky se symbolem „sterilní“ spolu se symbolem „teploměru“ (pro označení „sterilizace v autoklávu“). Na tato média se vztahují kritéria pro sterilní výrobky dle EP.[6]

V kapitole **Materiál, který není součástí dodávky** je uvedeno vybavení nutné pro provedení testu. Běžné materiály (například inokulační smyčky, pipety, inkubátory a podobně) zde uvedeny nejsou, jelikož se v mikrobiologické laboratoři běžně používají.

V kapitole **Typy vzorků** jsou uvedeny vzorky, které se používají s daným médiem. V případě potřeby naleznete zvláštní požadavky na odběr a transport vzorků v části **Odběr a transport.**

Vzorky je nutno odebírat a přepravovat odpovídajícím způsobem, pomocí vhodných transportních médií, aby se předešlo jejich vyschnutí, nadměrnému vystavení působení kyslíku nebo přemnožení komenzálních organismů. Důležitá je i doba mezi odebráním a zpracováním vzorku v laboratoři, která musí být co nejkratší. Na podrobné informace o metodách odběru a přepravy určitých patogenů odkazují příslušné odkazy.[8]

V kapitole **Provedení testu** naleznete všeobecné i specifické informace o inokulaci na určité médium; v případě potřeby je zde popsáno i použití doplňkových médií.

Inokulace médií
Součástí správného laboratorního postupu je inokulace vzorku na médium rozetřením ve třech krocích v každé misce, a to smyčkou sterilizovanou před každým krokem. Pokud používáte předsterilizované smyčky, musíte pro každý krok použít novou smyčku. Pokud je materiál kultivován přímo z tampónu, přejeďte tampónem přes malou část povrchu při kraji; poté pro izolaci ve dvou krocích rozetřete smyčkami inokulum z této části.
Tento postup umožňuje izolaci jednotlivých kolonií ze smíšených kultur. Čisté kultury získané z jednotlivých kolonií jsou nezbytné pro identifikaci a testování citlivosti izolátů.

Je zde uvedena i teplota a čas inkubace.

Ke správnému laboratornímu postupu patří i pravidelná kontrola **teploty inkubátorů**. Teploty vyšší nebo nižší než uvedený rozsah mohou mít za následek ztrátu životaschopnosti organismů v kulturách, snížení růstu nebo výsledky bez výpovědní hodnoty.
Během inkubace médií na miskách k okamžitému použití (zvláště pokud se jedná o inkubaci dlouhodobou) je nutno zajistit odpovídající **vlhkost**. V tomto případě by se neměly používat inkubátory s cirkulací vzduchu, poněvadž to může vést k výraznému vyschnutí médií, především pokud je v laboratoři nízká vlhkost. Miskové kultury mikroorganismů, které jsou adaptovány na vlhké prostředí (například *Legionella*) je nutno inkubovat ve vlhčených komorách nebo nádobách. Misky lze také utěsnit lepící páskou, aby se snížilo odpařování. Přitom však musí být stále umožněna minimální výměna vzduchu. To se týká i médií ve zkumavkách: šroubovací uzávěry by měly být během inkubace stále mírně povoleny.

V kapitole **Výsledky** naleznete informace o vzhledu organismů na určitých médiích. Pro obecnou izolaci a růstová média nelze uvést specifické informace o všech organismech schopných množit se na tomto médiu. Věnujte pozornost příslušným odkazům.[9]
V kapitole **Výpočet a interpretace výsledků** naleznete případné další informace. Tato část je uvedena, pokud diagnóza závisí na množství patogenů ve vzorku. Tak je tomu například u agaru CLED, který se používá pro počítání bakterií v moči.

ÚČINNOST A OMEZENÍ POSTUPU

V této části je popsána účinnost média a případně jsou zde uvedeny typy organismů, které lze na daném médiu izolovat, spolu s bezpečným zdrojem. U nově nebo nedávno zavedených médií zde mohou být uvedeny výsledky z hodnocení postupu.

Je nutno si uvědomit, že jediné médium většinou není vhodné pro detekci všech potenciálně důležitých organismů ze vzorku. V rámci mikrobiální populace se též mohou vyskytovat jednotlivé kmeny, které se na jistých médiích správně nemnoží, přestože je médium vhodné pro detekci většiny ostatních kmenů tohoto druhu. Proto se pro většinu vzorků souběžně inokulují dvě nebo tři různá média, nebo se neselektivní médium kombinuje s jedním či dvěma selektivními médii, případně se použijí dvě selektivní média s různým stupněm selektivity.

Zde jsou také uvedena známá specifická **omezení použití** daného média.
U většiny médií jsou ke konečné identifikaci izolovaných organismů nutné další testy.

ODKAZY

Zde je uvedena literatura použitá v tomto dokumentu

BALENÍ/DOSTUPNOST

Zde jsou uvedena **katalogová čísla, velikost balení** a případně rozdílné formáty.

DALŠÍ INFORMACE

Zde naleznete další informace včetně adresy výrobce (symbol pro „továrnu“). A konečně jsou zde uvedeny ochranné známky zmíněné v určitých dokumentech.

ODKAZY CITOVANÉ V TOMTO DOKUMENTU OBSAHUJÍCÍM VŠEOBECNÉ POKYNY K POUŽITÍ

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