

OPĆE UPUTE ZA UPORABU

Djelomično dovršeni i gotovi mediji

U ovom se dokumentu nalaze informacije o strukturi dokumenata s **Uputama za upotrebu**. On sadrži i dodatne informacije o uporabi **BD** djelomično dovršenih i gotovih medija.

U tekstualnim okvirima nalaze se dodatne informacije koje nisu navedene u pojedinim dokumentima Uputa za upotrebu.

Zaglavlje na prvoj stranici svih dokumenata sadrži **CE oznaku** ako je proizvod označen simbolom **IVD**, sukladno Europskoj IVD direktivi. Isto tako, naveden je **broj dokumenta i verzija** (npr. PA-123456.01 za pločaste medije i BA-123456.01 za medije u bočicama) kao i **datum revizije** (mjesec i godina). Verzija i broj dokumenta nalaze se u podnožju svake stranice.

Isto tako, naveden je i **naziv proizvoda**. Dio dokumenata **Uputa za upotrebu** sadrži opise nekoliko medija sa sličnim formulacijama i sličnom primjenom.

PRIMJENA

Navedeno je područje primjene. Ako se koristi u druge svrhe, korisnik mora ovjeriti medij ili postupak.

BD Sustavi za dijagnostiku ne preuzimaju odgovornost ako se proizvod koristi u svrhe, mikroorganizme i postupke koji se ne preporučuju u **Uputama za upotrebu**.

NAČELA I OBJAŠNJENJE POSTUPKA

U ovom je odjeljku navedeno načelo metode ("Mikrobiološka metoda,."). Nadalje, objašnjene su informacije o povijesti i razvoja medija, principi postupka i funkcija sastojaka (popisani u odjeljku **REAGENSI**).

REAGENSI

U ovom se odjeljku nalazi formula i pH-vrijednost proizvoda.

U tablici formula količine sastojaka [g, mg, µg, mL, IU, U, itd] spominju se samo jednom, a zatim u nastavku samo ako su promijenjene. **Primjer** se nalazi u nastavku:

BD CHROMagar O157

Formula* po litri pročišćene vode

Kromopepton	22,0 g	
Natrijev klorid	5,0	← <i>količina u [g]</i>
Kalijev telurit	2,5 mg	
Cefiksim	0,05	← <i>količina u [mg]</i>
Cefsulodin	4,0	← <i>količina u [mg]</i>
Posebna kromogena i selektivna mješavina	1,0 g	
Agar	12,0	← <i>količina u [g]</i>
pH: 7,1 +/- 0,2		

MJERE OPREZA

Ako su označeni **IVD**, **BD** djelomično dovršeni ili gotovi mediji služe za in vitro dijagnostiku, kao što je navedeno u Europskoj direktivi za in vitro dijagnostičke uređaje.¹ Oni se mogu koristiti i u ostalim poljima za mikrobiologiju, kao što je navedeno za pojedini proizvod.

Ovi proizvodi služe isključivo za profesionalnu upotrebu i smije ih koristiti samo školovano osoblje ili obučeno osoblje. Pacijenti ih ne smiju ispitivati sami na sebi.

Ako je označeno "Za laboratorijsku upotrebu,,", proizvodi su namijenjeni isključivo za uporabu u industrijskoj ili općoj mikrobiologiji, biotehnologiji ili općoj higijeni i ne mogu se koristiti za obradu humanih kliničkih uzoraka.

Ne koristite proizvod koji pokazuje znakove kontaminacije mikroorganizmima, čija se boja gubi, koji je osušen, ima pukotine ili druge znakove propadanja.

Uzorcima i proizvodom prije, tijekom i nakon upotrebe rukujte tako da ne dođe do zaraze.

Biološka i kemijska sigurnost proizvoda

U ovom se odjeljku mogu nalaziti informacije o posebnim biološkim i/ili kemijskim opasnostima, na koje ukazuju odgovarajući simboli i fraze "R,, (rizika) i "S,,(sigurnosti).²

Što se tiče rizika zbog materijala životinjskog porijekla, **BD** je predan nabavljanju takvog materijala prvenstveno iz Australije, Novog Zelanda i Sjedinjenih Država. Nijedna od ovih zemalja nije prijavila slučajeve BSE-a (goveđe spongiformne encefalopatije) kod domaće stoke. **BD** također nabavlja materijale životinjskog podrijetla iz drugih država [kao što su Argentina, Brazil, Kolumbija, Meksiko, Južna Afrika i Urugvaj]. Isto tako, nijedna od ovih zemalja nije prijavila slučajeve BSE-a kod domaće stoke.

Biološka opasnost od uzoraka i mikroorganizama uzgojenih na mikrobiološkim medijima

Poštujte uobičajene mjere opreza za mikrobiološke opasnosti. Uzorcima i kulturama mikroorganizama obavezno je rukovati sukladno lokalnim smjernicama i zakonima u vezi bioloških opasnosti. Sukladno Europskoj direktivi 2000/54/EC, većina bakterijskih i gljivičnih patogena uključena je u rizičnu grupu 2. Rizična grupa 3** stvorena je kako bi obuhvatila vrste *Salmonella* Typhi, enterohemoragijsku bakteriju *Escherichia coli* (EHEC; drugim imenom STEC = *E. coli* koja proizvodi toksin Shiga), *Shigella dysenteriae* (tip 1) te nekoliko drugih bakterija i gljiva. Između nekoliko drugih bakterijskih i gljivičnih patogena, u grupu 3 uključeni su svi patogeni *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulceran*, i *Histoplasma capsulatum*. Pojednostosti se nalaze u Dodatku III Direktive 2000/54/EC.³ Izravan pristup ovoj direktivi i ostalim europskim direktivama moguć je na stranici <http://europa.eu.int/eur-lex>

Odlaganje proizvoda

Nakon korištenja, a prije odlaganja, spremnici s uzorcima i cjelokupni kontaminirani materijal, uključujući i korištene medije za kulture i kontaminirane spremnike s kulturama, mora biti steriliziran autoklavom tijekom 20 - 30 minuta na temperaturi najmanje 121 °C (ako se moraju sterilizirati velike količine materijala za odlaganje) ili spaljeni prema provjerenim postupcima.

POHRANJIVANJE I ROK VALJANOSTI

BD gotovi pločasti mediji moraju se čuvati na temperaturi od +2 do +8 °C. Mediji u bočicama i čvrstim hranilištima (dipslides) moraju biti pohranjeni na istim ili različitim temperaturama.

Temperatura skladištenja, osim u posebnom dokumentu **Upute za upotrebu**, navedena je na naljepnici ili kutiji proizvoda.

Pazite da ne dođe do smrzavanja ili pregrijavanja.

Smrzavanje može u potpunosti uništiti agarozne gelove i uzrokovati taloženje tekućih medija. Duža izloženost temperaturama višim od preporučene temperature pohranjivanja može dovesti do propadanja sastojaka medija. Ovo posebice vrijedi za selektivne agense poput tvari protiv mikroorganizama. Nakon velikih promjena u temperaturama (npr. od 2 °C do 25 °C, a zatim ponovno 2 °C) moguće je stvaranje prekomjerne vlage na svim čvrstim medijima zbog kondenzacije vode. Pločasti mediji s viškom vlage prije inokulacije moraju se osušiti, primjerice postavljanjem s malo otkrivenim poklopcima u čist inkubator na temperaturu od 30 do 37 °C na najviše sat vremena. Ne isušujte medije! Točno vrijeme izlaganja ovisi o vlažnosti zraka u inkubatoru.

Naveden je i **rok trajanja otvorenog paketa**. Rok trajanja otvorenih zaliha pločastih medija odnosi se na pohranu u hladenom, čistom prostoru.

Korisnik mora izbjegavati kontaminaciju tijekom pohrane - primjerice, pakiranjem pločica u čiste plastične vrećice.

Za pohranjivanje medija u bočicama iz otvorenih jedinica pakiranja vrijedi rok valjanosti naveden na naljepnici, bočicama ili spremnicima ako medij nije otvoren.

Svi gotovi ili djelomično dovršeni mediji moraju biti pohranjeni na mračnom mjestu.

Ako su izloženi umjetnom svjetlu, sunčevu svjetlu ili UV svjetlu tijekom dužeg vremena, kvaliteta svojstava svih medija može se smanjiti. Neki mediji, poput kromogenih medija, Endo agara i drugih posebice su osjetljivi na jako osvjetljenje prije i tijekom inkubacije.

Svi **BD** gotovi ili djelomično dovršeni mediji mogu se koristiti do datuma **isteka valjanosti** i inkubirati preporučeni broj puta.

Na primjer, to obuhvaća inokulaciju mikobakterijskog medija na datum isteka valjanosti, nakon čega slijedi četiri do šest tjedana inkubacije. Tijekom inkubacije ne isušujte medij. Datum isteka valjanosti (simbol pješčanog sata) naveden je na zasebnim spremnicima i na naljepnici proizvoda. Na svim proizvodima korišten je format Godina-Mjesec-Dan. Na primjer, 2004-06-09 znači 9. lipnja 2004.

KORISNIČKA KONTROLA KVALITETE

Korisnik treba provoditi postupke kontrole kvalitete navedene u **Uputama za upotrebu**. Ispitni sojevi koji se ondje spominju često, no ne i uvijek, odgovaraju sojevima koji se koriste u postupcima kontrole kvalitete, koje proizvođač koristi prije puštanja proizvoda na tržište, a koji mogu sadržavati dodatne sojeve za ispitivanje. Koriste se sojevi iz centra American Type Culture Collection (= ATCC www.atcc.org), ali koriste se i sojevi iz europskih centara, npr. iz centra Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; www.dsmz.de) ili National Collection of Type Cultures (= NCTC; www.hpacultures.org.uk).

Na **Certifikatu analize** određenog pakiranja proizvoda navedena je jedinica soja za ispitivanje i rezultati koji su korišteni za puštanje proizvoda na tržište.

Postupci ispitivanja mikrobiološke izvedbe mogu ovisiti o vrsti medija i metodi koja je uslijedila.

Uvijek koristite svježe otopine sojeva za testiranje pripremljene pomoću kultura koje su preko noći odležale u odgovarajućim tekućim medijima (npr. Tryptic ili **Trypticase** sojin bujon za aerobe i Schaedlerov bujon s heminom i vitaminom K za anaerobe). Isto se tako mogu koristiti i svježe otopine, pripremljene pomoću kultura koje su preko noći odležale na pločastim medijima. Vrijeme inkubacije pretkultura mora se produžiti ako soj za testiranje sporo raste.

Za **testiranje nutritivnog kapaciteta pločastog medija** prema standardu CLSI M22 razrijedite inokulumsku otopinu kako biste dobili količinu 1 do 2×10^4 CFU po pločici.⁴ Ako na ovaj način ne dobijete izolirane kulture, trebate koristiti deset puta blaži inokulum. Sukladno standardu DIN EN 12322, svojstva koja pospješuju rast ispituju se pomoću 100 do 1000 CFU ili dovoljnom količinom CFU-a kako bi se odgovarajućom tehnikom razmazivanja pločastih medija dobile izolirane kolonije.⁵ Ako su sojevi inokulirani tehnikom kvantitativnog korištenja pločastih medija, najčešće je potrebno 50 do 500 CFU po pločici kako bi se stvorila brojiva količina kolonija. Sukladno smjernicama USP-a i EP-a, potrebno je koristiti 10 do 100 CFU po pločici (ili spremniku).^{6,7}

Za **testiranje inhibicijskog kapaciteta selektivnog pločastog medija**, sukladno CLSI M22, za inokulaciju potrebno je koristiti 1 do 2×10^5 CFU po pločici te otprilike još najmanje 10^4 CFU-a sukladno standardu DIN EN 12322.^{4,5} Visoka inokulacija neželjenih sojeva može "preopteretiti" medij, što dovodi do "buknuća".

Za usporedbu uvijek navedite referentni medij rasta, a to bi trebao biti neselektivni medij koji omogućuje optimalan rast svih sojeva za testiranje. Za aerobne sojeve agar Columbia s 5% ovčje krvi, za izbirljivije sojeve (poput soja *Neisseria gonorrhoeae*) čokoladni agar, a za anaerobne sojeve agar Schaedler s vitaminom K i 5% ovčje krvi, a za gljive prikladan je agar Sabouraud s glukozom. Ako vršite kvantitativno ispitivanje, rast "željenih" sojeva na mediju treba biti najmanje 70% rasta na referentnom mediju. Na selektivnim medijima rast "neželjenih" sojeva mora biti djelomično ili sasvim inhibiran. Stupanj inhibicije ovisi o mediju i sojevima, ali rast je obično smanjen faktorom 10^3 do 10^4 (ili većim) u usporedbi s rastom na neselektivnom referentnom mediju rasta.

Za ispitivanje **izvedbe rasta medija u spremnicima ili bočicama** koriste se usporedive metode. Manje tube ili spremnike potrebno je inokulirati pomoću 10^5 CFU, sukladno standardu CLSI M22-A2.⁴ Za postupke EP, USP i DIN EN 12322 potrebna je inokulacija koja je prethodno objašnjena za pločaste medije.⁵⁻⁷ Spremnike ili bočice sa zapreminom većom od 10 mL najprije je

potrebno razdijeliti u količine od 5 ili 10 mL, u sterilne bočice, te testirati na isti način.

Inokulirane medije inkubirajte i ispitajte prema opisu za svaki proizvod.

pH potencijometrijski odredite na sobnoj temperaturi (25 °C) kako biste provjerili pridržava li se vrijednosti koje su propisane za proizvod. pH raspon naveden u dokumentu **Uputa za upotrebu** određen je nakon proizvodnje medija. Tijekom roka valjanosti pH može lagano varirati i ovisiti o korištenom sustavu elektroda.

Sterilnost proizvoda korisnik može ispitati inkubiranjem nekoliko pločica (ili spremnika, primjerice bočica) pri temperaturi prikladnoj za inkubaciju (npr. 28 do 35 °C) tijekom 5 do 7 dana ili sukladno provedenim postupcima.^{6,7}

Na tekućim medijima koji su prirodno zamućeni nakon inkubacije potrebno je uzgojiti pretkulture na prikladnom čvrstom mediju (npr. **Trypticase** pločice s agarom od soje) kako biste odredili njihovu sterilnost. Isto tako, sojevi Gram i mikroskopija s medija mogu biti dragocjeni u slučaju da se vrijednosti ne mogu pouzdano odrediti.

POSTUPAK

U odjeljku **Priloženi materijal** navedeni su mediji i vrsta spremnika. Većina **BD** gotovih pločastih medija isporučuje se u **BD Stacker** posudicama od 90 mm koje su namijenjene smanjivanju rizika od proklizavanja zaliha. Dio **BD** gotovih pločastih medija isporučuje se u različitim vrstama posudica, poput podijeljenih posudica (=dvostrukih ploča), kontaktnih posudica, posudica od 150 mm ili kvadratnih posudica, ovisno o namjeni.

BD gotovi i djelomično dovršeni mediji u bočicama ili spremnicima dostupni su u različitim veličinama, zapreminama i s različitim zatvaranjem, ovisno o upotrebi i namjeni.

U nastavku slijede informacije o mikrobiološkom stanju proizvoda:

Pločasti mediji, čvrsta hranilišta (dipslides) i određeni mediji u bočicama i spremnicima punjeni su tako da nema opasnosti od zaraze; oni su "mikrobiološki kontrolirani". Za te medije standard DIN EN 12322 dopušta stopu zaraze od $\leq 5\%$.⁵ Međutim, interni kriteriji za puštanje na tržište stroži su. Mediji u bočicama sterilizirani u završnom spremniku označeni su oznakom "sterilno," i simbolom termometra (za "sterilizaciju autoklavom,"). Na te medije odnose se kriteriji sterilnih proizvoda sukladno EP-u.⁶

U odjeljku **Materijali koji nisu priloženi** navedena je posebna oprema potrebna za provođenje ispitivanja. Uobičajeni materijali poput ušica za inokulaciju, razmazivača, pipeta, inkubatora i sl. ovdje nisu navedeni jer se koriste u svim laboratorijima za mikrobiologiju.

U odjeljku **Vrste uzoraka** navedeni su uzorci koji se koriste s određenim medijem. Ako je potrebno, u odjeljku **Prikupljanje i transport** navedeni su posebni zahtjevi za prikupljanje i transport.

Uzorke je potrebno pravilno prikupiti i transportirati, koristeći odgovarajuće medije za transport kako bi se izbjeglo isušivanje, prekomjerna izloženost kisiku ili prekomjerni rast drugih organizama. Isto tako, vrijeme koje je potrebno od prikupljanja do obrade uzoraka u laboratoriju bitno je te mora biti što je moguće kraće. Pojediniosti o metodama prikupljanja i prijenosa određenih patogena potražite u odgovarajućim referentnim materijalima.⁸

U odjeljku **Postupak testiranja** navedene su opće i posebne informacije za inokulaciju određenog medija te je opisana upotreba dodatnih medija, u slučaju da za njima postoji potreba.

Inokulacija medija

U mikrobiološkim laboratorijima preporučljivo je izvršavati inokulaciju medija uzorkom razmazivanjem radi izolacije i to razmazivanjem u tri koraka na svaku pločicu, s time da ušicu prije svakog razmazivanja ponovno sterilizirate. Ako koristite unaprijed sterilizirane ušice, za svako razmazivanje potrebno je koristiti zasebnu ušicu. Ako se kultura nanosi na materijal izravno štapićem, štapić provaljajte po malom dijelu površine, na rubu, a zatim radi izolacije iz tog inokuliranog dijela površine ušicama razmažite kulturu u dva navrata. Ova tehnika omogućuje izolaciju pojedinačne kolonije iz više kultura. Čiste kulture, koje se dobivaju iz pojedinačnih kolonija, obavezne su za identifikaciju i testiranje podložnosti izolata.

Ovdje se također spominju temperatura i vrijeme inkubacije.

U laboratorijima je preporučljivo redovito provjeravati **temperaturu inkubatora**. Temperature koje su ispod ili iznad preporučenog raspona mogu dovesti do gubitka vijabilnosti organizama u kulturama, smanjenog rasta ili nemogućnosti reproduciranja.

Za vrijeme inkubacije gotovih pločastih medija omogućite odgovarajuću **vlažnost**, posebice ako se inkubiraju duže vrijeme. U tom slučaju, inkubatori s cirkulacijom zraka ne smiju se koristiti jer se mediji mogu značajno isušiti, posebice ako je vlažnost zraka u laboratoriju niska. Kulture mikroorganizama na pločastim medijima koje su prilagođene većini okruženja, kao što je *Legionella*, moraju biti inkubirane u ovlaživanim spremnicima ili staklenkama. Pločice trebaju biti pričvršćene ljepljivom trakom kako bi se smanjilo isparavanje. Međutim, minimalna izmjena plinova ipak mora biti moguća. Ovo vrijedi i za medije u tubama: tijekom inkubacije poklopci s navojem nikada ne smiju biti do kraja zavinuti.

U odjeljku **Rezultati** nalaze se informacije o pojavi organizama na određenom mediju. Za izolaciju opće namjene i medije za rast nije moguće navesti određene informacije za sve organizme koji mogu rasti na mediju. Za to potrebno je pogledati odgovarajuće referentne materijale.⁹

Određene informacije nalaze se u odjeljku **Izračun i tumačenje rezultata**. Ovaj je odjeljak naveden ako dijagnoza ovisi o količini patogena u uzorku. Primjerice, to vrijedi za medije poput agara CLED, koji služi za određivanje količine bakterija u urinu.

KARAKTERISTIKE SVOJSTAVA I OGRANIČENJA POSTUPKA

U ovom se odjeljku razmatraju svojstva medija i, ako je primjenjivo, vrste organizama koji mogu biti izolirani na mediju te dokazni izvori. Ovdje mogu biti navedeni rezultati procjene svojstava novih ili nedavno uvedenih medija.

Potrebno je naglasiti da je jedan medij tek rijetko prikladan za otkrivanje svih organizama od moguće važnosti u primjerku ili uzorku. Isto tako, postoje sojevi u populaciji mikroorganizama koji ne rastu pravilno na određenom mediju čak i ako je medij prikladan za otkrivanje većine ostalih sojeva te vrste. Stoga se za većinu primjeraka i uzoraka istodobno inokuliraju dva ili tri različita medija, neselektivni medij kombinira se s jednim ili dvama selektivnim medijima ili se koriste dva selektivna medija s različitim stupnjem selektivnosti.

Ovdje se spominju i određena poznata **ograničenja u primjeni** medija.

Za većinu medija potrebna su dodatna ispitivanja za dobivanje konačne identifikacije izoliranih organizama.

REFERENCE

Ovdje je navedena literatura citirana u dokumentu.

PAKIRANJE/DOSTUPNOST

Ovdje se spominju dostupni **kataloški brojevi**, **veličine pakiranja** i, ako je primjenjivo, različiti formati.

DODATNE INFORMACIJE

Ovdje se nalaze dodatne informacije, uključujući i adresu proizvođača (simbol za "tvornicu,,"). Navedeni su i zaštitni znakovi spomenuti u određenim dokumentima.

REFERENCE CITIRANE U DOKUMENTU OPĆIH UPUTA 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. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. Search for latest version at www.pheur.org
3. 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
4. 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.
5. 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