

INSTRUCȚIUNI GENERALE DE UTILIZARE

Medii pregătite pentru utilizare și parțial finalizate

Acest document furnizează informații referitoare la structura documentelor cu **Instrucțiuni pentru utilizare** și conține informații suplimentare referitoare la utilizarea mediilor **BD** gata de utilizare și parțial finalizate.

Nu sunt prevăzute în aceste casete de text instrucțiuni suplimentare ce nu au fost furnizate în documentele individuale cu instrucțiuni pentru utilizare.

Antetul din pagina 1 a tuturor documentelor conține **însemnul CE**, dacă produsul este un IVD conform Directivei¹ Europene IVD, precum și **numărul documentului și versiunea** (ex: **PA-123456.01** pentru mediile lamelare și **BA-123456.01** pentru mediile îmbuteliate) este prevăzută și data reviziei (lună și an). Numărul documentului și versiunea sunt repetate în **subsolul** fiecărei pagini.

În continuare, este prevăzut **numele produsului**. Unele documente cu **Instrucțiuni pentru utilizare** conțin descrierile mai multor culturi cu formulări și aplicabilități similare.

UTILIZARE SPECIFICĂ

Este indicată zona aplicării. Dacă se utilizează pentru alte aplicări, mediul de cultură sau procedura trebuie validată de utilizator.

BD Diagnostic Systems nu își asumă responsabilitatea dacă produsul este utilizat pentru aplicări, microorganisme sau proceduri ce nu au fost recomandate în Instrucțiunile de utilizare.

PRINCIPIILE ȘI EXPLICAȚIILE PROCEDURII

În această secțiune este ilustrat principiul metodologic („Metoda microbiologică”). De asemenea, sunt prezentate informații legate de istoria și dezvoltarea mediului de cultură, sunt explicate principiile de procedură și funcția ingredientelor listate ca **REACTIVI**.

REACTIVI

Această secțiune conține formula și pH-ul produsului.

În tabelul cu formule, cantitățile de ingrediente [g, mg, µg, mL, IU, U etc] sunt menționate doar o singură dată și ulterior doar dacă sunt modificate. Un **exemplu** este prezentat mai jos:

BD CHROMagar O157

Formulă* pentru un litru de apă purificată

Cromopeptonă	22,0 g	
Clorură de sodiu	5,0	←cantitate în [g]
Telurit de potasiu	2,5 mg	
Cefixim	0,05	← cantitate în [mg]
Cefsulodin	4,0	← cantitate în [mg]
Amestec special cromogenic și selectiv	1,0 g	
Agar	12,0	← cantitate în [g]
pH: 7,1 +/- 0,2		

PRECAUȚII

Dacă sunt etichetate **IVD**, mediile **BD** gata de utilizare sau parțial finalizate sunt destinate diagnosticării in vitro, conform precizării Directivei Europene pentru Dispozitive pentru diagnosticare in vitro.¹ Acestea pot fi, de asemenea, utilizate în alte domenii ale microbiologiei, conform precizării produsului respectiv.

Aceste produse sunt destinate exclusiv utilizării profesionale și trebuie utilizate numai de personal calificat sau instruit. Nu trebuie utilizate pentru testarea proprie efectuată de pacienți.

Dacă sunt etichetate „Pentru utilizare în laborator”, aceste produse sunt destinate exclusiv uzului microbiologic industrial sau de tip general, biotehnologiei sau igienei generale și nu trebuie utilizate pentru procesarea specimenelor umane clinice.

Nu utilizați produsele ce prezintă semne de contaminare microbiană, decolorare, deshidratare, fisuri sau alte semne de deteriorare.

Supravegheați manipularea aseptică a specimenelor și a produsului înainte, în timpul și după utilizare.

Siguranța biologică și chimică a produsului

Această secțiune poate conține, de asemenea, informații legate de anumite pericole biologice și/sau chimice, indicate de simbolurile adecvate, precum și de sintagmele adecvate R (risc)- și S (siguranță).²

Referitor la riscurile provocate de materialul animal utilizat, angajamentul **BD** este de a procura asemenea materiale în primul rând din Australia, Noua Zeelandă și Statele Unite. Nici una dintre aceste țări nu a raportat cazuri de BSE (encefalopatie bovină spongiformă) la vitele autohtone. **BD** procură materiale de origine animale și din alte țări [ex: Argentina, Brazilia, Columbia, Mexic, Africa de Sud și Uruguay]. Nici una dintre aceste țări nu a raportat cazuri de BSE la vitele autohtone.

Risc biologic provocat de specimene și microorganisme cultivate pe culturi microbiologice

Respectați măsurile de precauție adoptate pentru a combate pericolele microbiologice. Specimenele și culturile de microorganisme trebuie manipulate conform procedurilor acceptate și legislației referitoare la risc biologic pe plan local. Conform Directivei Europene 2000/54/EC, majoritatea agenților patogeni, bacterieni și fungi sunt incluși în grupa de risc 2. Grupa de risc 3** a fost creată pentru a include *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli* enterohemoragic (EHEC; cunoscut și ca STEC = *E. coli* ce produc toxina Shiga), *Shigella dysenteriae* (tip 1) și multe alte bacterii și fungi. Printre mulți alți patogeni bacterieni și fungi, toate speciile *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans*, and *Histoplasma capsulatum* sunt incluse în grupa de risc 3. Pentru detalii, consultați anexa III a Directivei 2000/54/EC.³ Această, precum și alte Directive Europene, pot fi accesate direct prin intermediul

www.europa.eu/index.htm

Eliminarea produselor

După utilizare și înaintea eliminării, containerele de specimene și toate materialele contaminate, inclusiv mediul de cultură utilizat și containerele de cultură contaminate, trebuie ținute în autoclavă timp de 20 până la 30 minute la o temperatură de 121 °C sau mai mult (dacă trebuie sterilizate volume mari de materiale eliminate) sau incinerate prin proceduri aprobate.

DEPOZITAREA ȘI DURATA DE DEPOZITARE

Mediile **BD** gata de utilizare trebuie depozitate la temperaturi cuprinse între +2 și +8 °C. Mijloacele de cultură îmbuteliate precum și lamele de tip dipslide trebuie depozitate la aceleași temperaturi sau la temperaturi de depozitare diferite.

În plus față de documentul respectiv cu **Instrucțiuni pentru utilizare**, temperatura de depozitare este specificată pe eticheta ambalajului sau pe cutia produsului.

Evitați congelarea sau supraîncălzirea.

Congelarea ar putea provoca deteriorarea integrală a gelurilor de agar sau precipitarea substanțelor lichide. Temperaturile ce depășesc temperaturile de stocare indicate pe parcursul unor perioade îndelungate pot determina deteriorarea ingredientelor mediilor. Această precauție este cu precădere aplicabilă pentru agenții selectivi precum agenții antibacterieni. Umezeala excesivă datorată condensului de apă ar putea apărea în urma schimbărilor succesive drastice de temperatură (ex.: de la 2 °C la 25 °C și înapoi la 2 °C) în cazul tuturor mediilor în stare solidă. Mediile lamelare cu umezeală excesivă trebuie uscate înaintea inoculării, ex.: prin amplasarea lor cu capacele deschise într-un incubator curat la temperaturi între 30 și 37 °C nu mai mult de o oră. Nu uscați mediile! Durata exactă de expunere depinde de umiditatea aerului din incubator.

Este indicată de asemenea **depozitarea pachetului deschis**. Depozitarea pachetelor de medii lamelare deschise menționate se referă la depozitarea la rece într-un loc curat.

Utilizatorul trebuie să evite contaminarea pe parcursul stocării, ex.: prin împachetarea lamelilor în pungi curate din plastic.

Pentru stocarea mediilor îmbuteliate din pachete deschise, este aplicabilă durata de depozitare prevăzută pe eticheta ambalajului și pe recipiente sau fiole, atât timp cât acestea nu au fost deschise.

Toate mediile gata de utilizare sau parțial finalizate trebuie stocate la întuneric.

În cazul expunerii la lumină artificială, lumina soarelui sau lumina UV pentru perioade îndelungate de timp, performanțele mediilor ar putea avea de suferit. Mai multe medii, precum cele cromogenice, Endo Agar și altele prezintă o sensibilitate aparte la iluminat puternic înainte și în timpul incubației.

Toate mediile **BD** gata de utilizare sau parțial finalizate trebuie consumate înaintea datei de expirare și incubate conform perioadelor de incubare recomandate.

De exemplu, aceasta include inocularea unui mediu micobacterial în ziua expirării, urmată de patru până la șase săptămâni de incubare. Evitați uscarea mediului în timpul incubării.

Data expirării (simbol clepsidră) este indicată pe containerele individuale și pe eticheta ambalajului. Pentru toate produsele este utilizat formatul An-Lună-Zi, ex.: 2004-06-09 înseamnă 9 iunie, 2004.

CONTROLUL CALITĂȚII EFECTUAT DE UTILIZATOR

Procedurile de control al calității indicate în **Instrucțiunile de utilizare** trebuie efectuate de utilizator. Tulpinile de testare menționate acolo corespund de obicei, dar nu întotdeauna, cu tulpinile utilizate în cadrul procedurilor de control al calității în vederea testării pentru punerea la dispoziție efectuate de producător ce pot include și tulpini de probă suplimentare. Cel mai adesea, sunt utilizate tulpini provenind din American Type Culture Collection (= ATCC™; www.atcc.org), dar sunt folosite de asemenea și tulpini din colecții europene, ex.: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; www.dsmz.de) sau National Collection of Type Cultures (= NCTC; www.hpacultures.org.uk).

Consultați **Certificatul de Analiză** al lotului respectiv de produse, ce prevede bateria respectivă de tulpină și rezultatele utilizate pentru punerea lotului la dispoziție.

Procedurile de efectuare a unui test de performanță microbiologică pot depinde de tipul de mediu și metoda aplicată.

Utilizați întotdeauna suspensii de tulpini de testare proaspete, preparate din culturi crescute peste noapte în mediu lichid adecvat (ex.: Tryptic sau **Trypticase**, lichid de cultură din soia pentru organisme aerobe și lichid de cultură Schaedler cu hemină și vitamina K pentru organisme anaerobe). Ca alternativă, pot fi utilizate suspensiile proaspete preparate din culturi crescute peste noapte în mediu lamelar. Durata de incubare a preculturilor trebuie extinsă dacă tulpina de testare se dezvoltă prea încet.

Pentru a testa capacitatea nutritivă a unui mediu lamelar conform standardului M22 al CLSI, diluați suspensia vaccinului pentru a asigura 1 până la 2×10^4 unități formatoare de colonii per lamelă. Conform DIN EN 12322, proprietățile ce favorizează creșterea sunt testate cu 10 până la 1000 unități formatoare de colonii sau un număr suficient de UFC astfel încât să furnizeze colonii izolate prin intermediul unei tehnici adecvate de însămânțare.⁵ Dacă tulpinile sunt inoculate printr-o tehnică cantitativă de extragere pe lamelă, un număr de 50 până la 500 UFC este de obicei adecvat pentru a obține o sumă de colonii ce poate fi numărată. Respectând instrucțiunile USP și EP, trebuie utilizate 10 până la 100 UFC pe lamelă (sau container).^{6,7}

Pentru testarea capacității de inhibare a unui mediu lamelar selectiv, conform CLSI M22, trebuie utilizate pentru inoculare 1 până la 2×10^5 UFC per lamelă și aproximativ 10^4 sau mai multe UFC conform DIN EN 12322.^{4,5} Concentrații prea mari de vaccin derivat din tulpini nedorite ar putea „supraîncărca” mediul, conducând la creșteri „record”.

Pentru comparare, includeți întotdeauna un mediu de creștere de referință care ar trebui să fie un mediu neselectiv ce facilitează creșterea optimă a tuturor tulpinilor de testare. Pentru tulpini aerobe, Columbia Agar cu 5% sânge de ovină, pentru tulpini pretențioase la nutriție (precum *Neisseria gonorrhoeae*) este recomandat Chocolate Agar, pentru organisme anaerobe este recomandat Schaedler Agar cu vitamina K și 5% sânge de ovină, iar pentru fungi cel mai adecvat scopului este folosirea de agar Sabouraud cu

glucoză. Dacă este testată cantitativ, creșterea tulpinilor „dorite” în mediul de testare ar trebui să fie cel puțin 70% din cea înregistrată în mediul de referință. În medii selective, creșterea tulpinilor „nedorite” trebuie să fie inhibată parțial sau integral. Nivelul de inhibiție depinde de mediu și de tulpini, dar creșterea este de obicei redusă de obicei cu 10^3 până la 10^4 ori (sau mai mult) în comparație cu creșterea din mediul de creștere neselectiv de referință.

Pentru a testa **performanța de creștere a mediului în fiole sau sticle**, sunt utilizate metode asemănătoare. Tuburi mai mici și fiole ar trebui inoculate cu 10^5 unități formatoare de colonii conform standardului CLSI M22.⁴ Procedurile EP, USP și DIN EN 12322 necesită același vaccin listat mai sus pentru mediile lamelare.⁵⁻⁷ Fiolele sau sticlele cu volum de umplere peste 10 mL ar trebui umplute parțial cu măsuri de 5 sau 10 mL în tuburi sterile și testate în același fel.

Incubați și inspecțai mediile inoculate așa cum este descris pentru produsul respectiv.

Stabiliți **pH**-ul cu ajutorul potențiometrului la temperatura camerei (25° C) pentru adecvarea la valorile specificate pentru produs. Intervalul pH prevăzut în documentul cu **Instrucțiuni pentru utilizare** este cel stabilit după fabricarea mediului. Acesta ar putea varia ușor în funcție de durata de depozitare și ar putea depinde de sistemul de electrozi folosit.

Sterilitatea produsului poate fi testată de utilizator prin incubarea mai multor lamele (sau containere, ex.: sticle) la o temperatură adecvată de incubare (ex.: de la 28 la 35 °C) timp de 5 până la 7 zile sau conform procedurilor ce trebuie urmate.^{6,7}

Mediile lichide cu o stare tulbure naturală ar trebui să fie cultivate în vederea unei subculturi pe un mediu solid adecvat (ex.: lamele cu agar de soia **Trypticase**) după incubare pentru a stabili sterilitatea. De asemenea, petele Gram și datele microscopice prelevate din mediu pot fi valorificate în cazul investigării.

PROCEDURĂ

În **Materiale furnizate**, sunt indicate mediile și tipul recipientului. Majoritatea mediilor lamelare gata de utilizare **BD** sunt furnizate în vase de 90mm **BD Stacker**, proiectate să se blocheze pentru a minimiza riscul alunecării stivelor. Anumite medii lamelare gata de utilizare **BD** sunt furnizate în tipuri diferite de capsule, precum capsule împărțite (=capsule duble), capsule de contact, capsule de 150mm sau capsule rectangulare, în funcție de aplicabilitate. Mediile **BD** gata de utilizare sau parțial finalizate din sticle sau fiole sunt disponibile în multe dimensiuni diferite, capacități de umplere și cu închideri diferite, în funcție de utilizarea lor și aplicabilitate.

Aici sunt prevăzute informații despre starea microbiologică a produsului:

Mediile lamelare, lamelele de tip dipslide și anumite medii în sticle sau fiole sunt umplute aseptice; acestea sunt „controlate microbiologic”. Pentru aceste medii, standardul DIN EN 12322 permite o rată de contaminare de $\leq 5\%$.⁵ Cu toate acestea, criteriile interne de punere la dispoziție sunt mai drastice. Mediile îmbuteliate care sunt sterilizate în recipientul lor final sunt etichetate cu simbolul „steril”, împreună cu simbolul „termometru” (pentru „sterilizare prin autoclavizare”). Pentru aceste medii se aplică criteriul produselor sterile conform EP.⁶

În **Materiale ce nu sunt furnizate** sunt indicate echipamentele necesare efectuării testului. Materialele obișnuite, precum anse de inoculare, retractoare, pipete, incubatoare etc. nu sunt menționate aici, deoarece sunt necesare în orice laborator de microbiologie.

În **Tipuri de specimen**, sunt indicate specimenul(ele) ce trebuie folosit(e) pentru anumite medii. Acolo unde este necesar, sunt indicate cerințele speciale pentru colectare și transportarea specimenelor în **Colectare și transport**.

Specimenele trebuie colectate și transportate corespunzător, utilizând medii adecvate transportării pentru a evita asanarea, expunerea excesivă la oxigen sau creșterea exagerată a organismelor comensuale. De asemenea, durata de la colectare la procesarea în laborator a specimenelor este importantă și trebuie să fie cât mai scurtă. Pentru detalii legate de metodele de colectare și transportare pentru anumiți patogeni, trebuie consultate referințele adecvate.⁸

În **Procedura de testare** este descrisă informația generală și specifică legată de inocularea unui mediu specific și, dacă e necesar, utilizarea mediilor suplimentare.

Inocularea mediilor

În microbiologie, există o regulă de procedură în laborator conform căreia inocularea mediului cu specimenul este efectuată prin însămânțare pentru izolare, urmând trei etape de însămânțare pe fiecare lamelă cu o ansă sterilizată din nou după fiecare etapă de înmulțire pe lamelă. Dacă sunt utilizate anse sterilizate în prealabil, trebuie utilizată o ansă diferită pentru fiecare etapă a însămânțare. Dacă materialul este cultivat direct dintr-un tampon, rulați tamponul la extreme pe o zonă restrânsă a suprafeței; însămânțați din nou pe lamelă pentru izolare din această zonă inoculată, urmând doi pași de însămânțare.

Această tehnică permite izolarea coloniilor singulare din culturi variate. Pentru identificare și testare a sensibilității izolărilor sunt obligatorii culturile pure, obținute din colonii singulare.

Este menționată aici, de asemenea, temperatura și durata de incubare.

Există o regulă de procedură în laborator conform căreia este necesară inspecția periodică a **temperaturii reale a incubatoarelor**. Temperaturile sub și peste intervalul comunicat pot dăuna viabilității organismelor în culturi, creștere redusă sau rezultate ce nu pot fi reproduse.

În timpul incubării mediilor lamelare gata de utilizare, asigurați **umiditatea** adecvată, mai ales dacă acestea sunt incubate pe o perioadă îndelungată de timp. În acest caz, nu ar trebui utilizate incubatoare cu ventilație, deoarece mediile ar putea fi semnificativ asanate, mai ales atunci când umiditatea aerului din laborator este scăzută. Culturile lamelare cu organisme ce sunt adaptate la medii umede, ex.: *Legionella*, trebuie incubate în încăperi sau în borcane cu umiditate. Lamelele pot fi de asemenea sigilate cu bandă adezivă pentru a reduce evaporarea. Cu toate acestea, un schimb minim de gaze trebuie permis.

Aceasta se aplică de asemenea mediilor din tuburi: capacele cu înșurubare trebuie să fie slăbite ușor în timpul incubării.

În secțiunea **Rezultate** sunt furnizate informații despre prezența organismelor pe mediile specifice. Pentru izolare ca uz general și medii de cultură, această informație nu poate fi valabilă pentru toate organismele ce pot crește în mediul respectiv. Trebuie consultată bibliografia adecvată.⁹

În cele din urmă, informația respectivă este furnizată în **Calcularea și Interpretarea Rezultatelor**. Această secțiune este disponibilă în cazul în care diagnosticul depinde de numărul patogenilor dintr-un specimen. **Spre exemplu, această supoziție este adevărată pentru medii precum agar CLED, utilizat pentru evaluarea numărului de bacterii din urină.**

CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ȘI LIMITĂRILE PROCEDURII

Performanța mediului este dezbătută și, dacă aceasta se aplică, sunt prevăzute tipurile de organisme care pot fi izolate în mediu, împreună cu surse doveditoare. Pentru medii noi sau introduse recent, aici ar putea fi incluse rezultate evaluărilor performanțelor.

Trebuie subliniat faptul că un singur mediu este doar arareori adecvat detectării tuturor organismelor potențial importante dintr-un specimen sau mostră. De asemenea, ar putea exista tulpini singulare în cadrul unei populații microbiene ce nu cresc adecvat într-un anumit mediu cu toate că mediul este propice detectării majorității celorlalte tulpini ale aceleiași specii. În consecință, pentru majoritatea specimenelor și eșantioanelor, sunt inoculate simultan două sau trei medii diferite sau un mediu non-selectiv este combinat cu una sau mai multe medii selective sau sunt utilizate două medii selective cu grade diferite de selectivitate.

De asemenea, sunt menționate aici **limitări cunoscute ale aplicabilității** mediului. Pentru majoritatea mediilor, sunt necesare teste suplimentare pentru a obține o identificare finală a organismelor izolate.

REFERINȚE

Aici este menționată documentația citată în document.

AMBALAJ/DISPONIBILITATE

Aici sunt menționate **numărul de catalog, dimensiunile de ambalare** și, dacă este cazul, formatele diferite.

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

Aici sunt prevăzute informații suplimentare, inclusiv adresa producătorului (simbolul pentru „fabrică”). În final sunt prevăzute mărcile înregistrate menționate în documentele respective.

REFERINȚE CITATE ÎN ACEST DOCUMENT CU INSTRUCȚIUNI GENERALE PENTRU UTILIZARE

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