VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE
Pôdy pripravené na použitie a čiastočne pripravené pôdy

Tento dokument poskytuje informácie o štruktúre **Pokynov na používanie** a obsahuje ďalšie informácie o používaní pôd pripravených na použitie a čiastočne pripravených pôd **BD™**.

Tu v rámčekoch nájdete ďalšie informácie, ktoré nie sú súčasťou jednotlivých pokynov na používanie.

Ak je produkt podľa Európskej smernice IVD[1] určený na diagnostiku in vitro - IVD, je vo všetkých dokumentoch v **hlavičke** na prvej strane **značka CE**. Uvedené je aj **číslo dokumentu** a ***verzia*** (napr. PA-**123456**.***01*** pri pôdach v Petriho miskách a BA-**123456**.***01*** pri pôdach vo fľašiach) a **dátum revízie** (mesiac a rok). Číslo dokumentu a verzia sú aj v **päte** každej strany.

Potom je uvedený **názov produktu**. Niektoré pokyny na používanie obsahujú popisy niekoľkých pôd s podobnými formuláciami a aplikáciami.

POUŽITIE
Tu je uvedená oblasť použitia. Pri inom použití než je uvedené, musí pôdu alebo postup overiť používateľ.

Diagnostické systémy **BD** nenesú zodpovednosť v prípade, ak sa produkt použije na inú aplikáciu, iné mikroorganizmy alebo iné postupy, než sú odporúčané v **pokynoch na používanie**.

PRINCÍPY A VYSVETLENIE POSTUPU
V tejto časti je uvedený princíp metódy („Mikrobiologická metóda“). Je tu takisto vysvetlená história a vývoj pôdy, princípy postupu a funkcia zložiek vymenovaných v časti **ZLOŽENIE**.

ZLOŽENIE
Táto časť obsahuje zloženie a hodnotu pH daného produktu.

V tabuľke zloženia sú množstvá zložiek [v g, mg, µg, ml, IU, U atď.] spomenuté len raz a ďalej len v prípade zmeny. **Príklad** je uvedený nižšie:

Pôda BD CHROMagar™ O157
Zloženie* na jeden liter deionizovanej vody

Chromopeptón	22,0 g	
Chlorid sodný	5.0	←***množstvo v [g]***
Teluran draselný	2,5 mg	
Cefixím	0.05	← ***množstvo v [mg]***
Cefsulodin	4.0	← ***množstvo v [mg]***
Špeciálna chromogénová a selektívna kombinácia	1,0 g	
Agar	12.0	← ***množstvo v [g]***

pH: 7,1 +/- 0,2

UPOZORNENIA

Pôdy pripravené na použitie alebo čiastočne pripravené pôdy označené IVD, sú určené na diagnostiku in vitro tak, ako udáva Európska smernica o diagnostike in vitro.[1] Môžu sa tiež využiť v iných oblastiach mikrobiológie tak, ako je uvedené na príslušnom produkte.
Tieto produkty sú určené len na profesionálne použitie a môže ich používať iba zaškolená a zapracovaná osoba. Nesmú ich používať pacienti na samovyšetrenie.
Produkty označené „Na použitie v laboratóriu“ sú určené len na použitie v priemyselnej alebo všeobecnej mikrobiológii, biotechnológii alebo všeobecnej hygiene a nesmú sa používať na spracovanie ľudských klinických vzoriek.

Produkt nepoužívajte, ak nesie známky mikrobiálnej kontaminácie, zmenu farby, vysušenie, prasknutie alebo iné znaky poškodenia.

Pred použitím, počas neho aj po ňom sa riaďte pokynmi na aseptické spracovanie vzoriek a produktov.

Biologická a chemická bezpečnosť produktu
Táto časť môže obsahovať aj informácie o špecifických biologických alebo chemických rizikách označené symbolmi a vhodnými značkami R (rizikový) a S (bezpečný).[2]

Čo sa týka rizika vychádzajúceho z použitia materiálu zvieracieho pôvodu, materiály spoločnosti BD pochádzajú predovšetkým zo zdrojov z Austrálie, Nového Zélandu a Spojených štátov. Žiadna z týchto krajín nezaznamenala u svojho dobytka prípady BSE (bovinná spongiformná encephalopatia). Spoločnosť BD zásobuje aj iné krajiny (napr. Argentínu, Brazíliu, Kolumbiu, Mexiko, JAR a Uruguaj) materiálmi zvieracieho pôvodu. Žiadna z týchto krajín neohlásila u svojho dobytka prípady BSE.

Biologické riziko pochádzajúce zo vzoriek a mikroorganizmov vypestovaných na mikrobiologických pôdach
Dodržiavajte schválené preventívne opatrenia proti mikrobiálnemu riziku. Zaobchádzajte so vzorkami a kultúrami mikroorganizmov v súlade s miestnymi smernicami a zákonmi o biologickom riziku. Podľa Európskej smernice 200/54/EC je väčšina bakteriálnych a hubových patogénov v rizikovej skupine 2. Riziková skupina 3** bola vytvorená pre baktérie rodu *Salmonella* Typhi, enterohemorhagickú baktériu rodu *Escherichia coli* (EHEC; nazývanú tiež STEC = baktéria *E. coli* produkujúca Shiga toxín), baktéria *Shigella dysenteriae* (typ 1) a niekoľko ďalších baktérií a húb. Z ďalších bakteriálnych a hubových patogénov sú do rizikovej skupiny 2 zaradené všetky druhy baktérie *Brucella*, baktérie *Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. ulcerans* a *Histoplasma capsulatum*. ďlašie informácie nájdete v Prílohe III Smernice 2000/54/EC.[3] Túto aj iné smernice nájdete na stránke **www.europa.eu/index.htm**.

Likvidácia produktu
Nádoby so vzorkami a všetok kontaminovaný materiál vrátane použitých kultivačných pôd a kontaminovaných nádob s kultúrou po použití a pred likvidáciou sterilizujte autoklávom 20 až 30 minút pri teplote 121 °C alebo vyššej (pokiaľ treba sterilizovať veľké množstvo použitého materiálu) alebo spáľte schváleným postupom.

USKLADNENIE A ŽIVOTNOSŤ

Pôdy spoločnosti **BD** v Petriho miskách pripravené na použitie uchovávajte pri teplote 2 až 8 °C. Pôdy vo fľašiach a v podložných sklíčkach s jamkou uchovávajte pri rovnakej alebo rozdielnej teplote.

Okrem **Pokynov na používanie** sú skladovacie teploty uvedené aj na štítku na obale alebo na škatuli s produktom.

Nezmrazujte a nevystavujte nadmerným teplotám.

Zmrazenie môže spôsobiť znehodnotenie agarového gélu alebo zrazenie tekutých pôd. Dlhodobé vystavenie teplotám presahujúcim uvedené skladovacie teploty môže zapríčiniť znehodnotenie zložiek pôdy. To platí najmä pri selektívnych látkach, napríklad bakteriostatikách.
Po extrémnych teplotných zmenách (napr. z 2 °C na 25 °C a späť na 2 °C) môže na pevných pôdach vzniknúť prílišná vlhkosť pôsobením zrážania vody. Pôdy v Petriho miskách s prílišnou vlhkosťou musíte pred naočkovaním vysušiť, napríklad tak, že ich umiestnite s pootvoreným uzáverom do čistého inkubátora pri teplote 30 až 37 °C najviac na jednu hodinu. Pôdy nevysušujte! Presný čas vystavenia závisí od vlhkosti vzduchu v inkubátore.

Uvedené sú aj **skladovacie podmienky otvoreného balenia**. Uvedené skladovacie podmienky pre otvorené balenia pôd v Petriho miskách za vzťahujú na uskladnenie na chladnom a čistom mieste.

Používateľ musí predísť kontaminácii počas uskladnenia napríklad tak, že Petriho misky zabalí do čistých plastových vreciek.

Čo sa týka uskladnenia pôd vo fľašiach z otvorených balení, životnosť uvedená na štítku na obale alebo na fľašiach alebo liekovkách platí dovtedy, kým sa neotvoria.

Všetky pôdy pripravené na použitie alebo čiastočne pripravené pôdy sa musia uchovávať na tmavom mieste.

Pri vystavení umelému osvetleniu alebo UV žiareniu počas dlhšej doby sa môže znížiť výkonnosť všetkých pôd. Niektoré pôdy, napríklad chromogénne pôdy, pôda Endo Agar a iné, sú obzvlášť citlivé na silné žiarenie pred a počas inkubácie.

Všetky pôdy pripravené na použitie alebo čiastočne pripravené pôdy od spoločnosti **BD** sa môžu použiť do dňa **exspirácie** a inkubovať počas odporúčanej doby inkubácie.

To napríklad znamená, že mykobakteriálna pôda môže byť naočkovaná v deň exspirácie a ďalšie štyri alebo šesť týždňov bude inkubovaná. Počas inkubácie sa pôda nesmie vysušiť.
Dátum exspirácie (symbol presýpacích hodín) je uvedený na jednotlivých

nádobách a na štítku na obale. Na všetkých produktoch je použitý formát: rok-mesiac-deň, napr. 2004-06-09 znamená 9. júna 2004.

KONTROLA KVALITY

Používateľ musí dodržiavať postupy pri kontrole kvality, ktoré sú uvedené v **Pokynoch na používanie**. Testované kmene uvedené v tejto časti väčšinou, ale nie vždy, zodpovedajú kmeňom použitým pri postupoch pri kontrole kvality testu uvoľňovania od výrobcu, ktoré môžu obsahovať ďalšie stimulačné kmene. Najčastejšie sa používajú kmene zo zbierky American Type Culture Collection (= ATCC™; **www.atcc.org**), ale používajú sa aj kmene z európskych zbierok, napríklad Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; **www.dsmz.de**) alebo the National Collection of Type Cultures (= NCTC; **www.hpacultures.org.uk**).

V **Osvedčení o analýze** k príslušnej šarži produktu nájdete súpravu skutočne testovaných kmeňov a výsledky použité na uvoľnenie šarže.

Postupy pri mikrobiologickom teste môžu závisieť od typu pôdy a použitej metódy.

Používajte vždy čerstvé testovacie suspenzie pripravené z jeden deň starých kultúr vo vhodných tekutých pôdach (napr. v pôde Tryptic alebo v sójovom bujóne **Trypticase**™ pri aeróbnych mikroorganizmoch a v bujóne Schaedler s hemínom a vitamínom K pri anaeróbnych mikroorganizmoch). Prípadne môžete použiť čerstvé suspenzie pripravené z jeden deň starých kultúr na pôdach v Petriho miskách. Ak testovací kmeň rastie pomaly, predĺžte dobu inkubácie predkultúr.
Ak chcete vykonať **test nutričnej kapacity pôdy v Petriho miskách** podľa normy M22 komisie CLSI, zriďte očkovaciu suspenziu tak, aby ste získali 1 až 2 x 10^4 CFU na jednu misku.[4] Použite desaťnásobne slabšiu očkovaciu látku, ak neposkytuje izolované kolónie. Podľa smernice DIN EN 12322 sa vlastnosti podporujúce rast testujú vhodnou očkovacou technikou na Petriho miske[5] 100 až 1000 jednotkami CFU alebo dostatočným množstvom CFU, ktoré poskytne izolované kolónie. Pokiaľ sa kmene naočkujú kvantitatívnou technikou na Petriho miske, je zvyčajne potrebných 50 až 500 jednotiek CFU na jednu misku, aby sa dosiahlo spočítateľné množstvo kolónií. Podľa smerníc centra USP a Európskeho parlamentu je nutné použiť 10 až 100 jednotiek CFU na jednu misku (alebo nádobu).[6,7]

Na **testovanie inhibičnej kapacity selektívnej pôdy v Petriho miskách** treba podľa normy M22 komisie CLSI na očkovanie použiť 1 až 2 x 10^5 jednotiek CFU na jednu misku a podľa smernice DIN EN 12322 približne 10^4 alebo viac jednotiek CFU.[4,5] Veľmi veľké množstvo očkovacej látky nežiaducich kmeňov môže pôdu preťažiť, čo môže viesť k „nečakanému“ rastu.
Na porovnanie vždy pridajte rastovú referenčnú pôdu, ktorou by mala byť neselektívna pôda, ktorá poskytne všetkým testovacím kmeňom optimálny rast. Na tento účel sú vhodné tieto pôdy: pôda Columbia Agar with 5% Sheep Blood na aeróbne kmene, pôda Chocolate Agar na náročné kmene (napríklad kmeň *Neisseria gonorrhoeae*), pôda Schaedler Agar with Vitamin K and 5% Sheep Blood na anaeróbne kmene a pôda Sabouraud Glucose Agar na huby. Pri kvantitatívnom testovaní by mal rast „žiaducich“ kmeňov na testovacej pôde dosiahnuť najmenej 70 % z rastu dosiahnutého na referenčnej pôde. Na selektívnych pôdach musí byť rast „nežiaducich“ kmeňov čiastočne alebo úplne inhibovaný. Stupeň inhibície závisí od pôdy a od kmeňov, ale faktor hodnoty 10^3 až 10^4 (alebo viac) väčšinou redukuje rast v porovnaní s rastom na neselektívnej rastovej referenčnej pôde.

Na testovanie **rastového účinku pôd v liekovkách alebo fľašiach** sa používajú porovnateľné metódy. Menšie skúmavky a liekovky treba podľa normy M22 komisie CLSI naočkovať 10^5 cfu.[4] Postupy podľa Európskeho parlamentu, centra USP a smernice DIN EN 12322 vyžadujú rovnaké množstvo očkovacej látky, ako je uvedené vyššie pri pôdach v Petriho miskách.[5-7] Liekovky alebo fľaše s objemom viac ako 10 ml sa musia najskôr rozdeliť do sterilných skúmaviek tak, aby mali objem 5 alebo 10 ml, až potom sa budú rovnakým spôsobom testovať.

Naočkované pôdy inkubujte a kontrolujte tak, ako sa pri danom produkte odporúča.

Potenciometrom pri izbovej teplote (25° C) stanovte **pH**, aby sa zachovali hodnoty špecifické pre daný produkt. V **Pokynoch na používanie** je uvedený rozsah pH, ktorý sa určil po výrobe pôdy. Môže sa trochu líšiť podľa životnosti a môže závisieť od používaného systému elektród.

Používateľ môže testovať **sterilitu produktu** naočkovaním niekoľkých misiek (alebo nádob, napr. fliaš) pri vhodnej inkubačnej teplote (napr. 28 až 35 °C) počas 5 až 7 dní alebo takým postupom, ktorý je v danom prípade vhodný.[6,7]

Tekuté pôdy s prirodzeným zákalom treba po inkubácii subkultivovať do vhodnej pevnej pôdy (napr. do sójových agarových misiek **Trypticase™**), aby sa stanovila sterilita. V prípade neistoty je užitočné vykonať z týchto pôd Gramovo farbenie a mikroskopiu.

POSTUP

V časti **Dodávaný materiál** sú uvedené pôdy a typ nádoby. Väčšina pôd spoločnosti **BD** v Petriho miskách pripravených na použitie sa dodáva v miskách **BD Stacker™** s objemom 90mm, ktoré sú navrhnuté tak, aby sa znížilo riziko zošmyknutia balenia. Určité pôdy spoločnosti **BD** v Petriho miskách sa dodávajú v rôznych typoch misiek, v závislosti od aplikácie, napríklad rozdelené misky (=dvojité misky), kontaktné misky, misky s dĺžkou 150 mm alebo štvorcové misky.
Pôdy pripravené na použitie alebo čiastočne pripravené pôdy od spoločnosti **BD** vo fľašiach alebo v liekovkách sú dostupné v rôznych veľkostiach, objemoch a s rôznymi uzávermi, v závislosti od použitia a aplikácie.
Tu nájdete informácie o mikrobiologickom stave produktu :

Pôdy v miskách, podložné sklíčka a niektoré pôdy vo fľašiach alebo liekovkách sú naplnené asepticky; sú „mikrobiologicky kontrolované“. Pri týchto pôdach povoľuje smernica DIN EN 12322 rozsah kontaminácie $\leq$ 5 %.[5] Prísnejšie sú však vnútorné kritéria uvoľňovania.
Pôdy vo fľašiach, ktoré sa sterilizujú v konečnej nádobe, sú označené symbolom „sterilné“ a symbolom „teplomer“ (ktorý znamená „sterilizované autoklávom“). Pri týchto pôdach platia kritériá pre sterilné produkty podľa Európskeho parlamentu.[6]

V časti **Nedodávaný materiál** je uvedené špeciálne vybavenie nevyhnutné na tento test. Tradičný materiál, napríklad očkovacie kľučky, rozvierače, pipetory, inkubátory atď. nie sú v tejto časti uvedené, pretože sú v mikrobiologickom laboratóriu všeobecne potrebné.

V časti **Typy vzoriek** je uvedená vzorka (vzorky), ktoré sa s majú s danou pôdou použiť. V časti **Odber a prenos vzoriek** sú v prípade nevyhnutnosti uvedené špeciálne požiadavky na odber a prenos vzoriek.

Vzorky musia byť odobraté a prenášané vhodným spôsobom pomocou vhodných pôd na prenos, aby sa predišlo vysušeniu, prílišnému vystaveniu kyslíku alebo prílišnému rastu parazitárnych organizmov. Dôležitý je aj čas potrebný na odber a spracovanie vzoriek v laboratóriu a musí byť čo najkratší. Ďalšie informácie o metódach odberu a spracovania špecifických patogénov nájdete v príslušnej literatúre.[8]

V časti **Postup testu** sú opísané všeobecné a špecifické informácie o očkovaní určitej pôdy a v prípade nevyhnutnosti aj o použití ďalších pôd.

Očkovanie pôd
V mikrobiológii je dobrým laboratórnym zvykom, že očkovanie pôd vzorkami sa vykonáva naočkovaním pri izolácii, aplikovaním troch čiar na každú misku pri opätovnej sterilizácii kľučky pred každou čiarou. Pri použití predsterilizovaných kľučiek treba použiť na každú čiaru novú kľučku. Ak sa materiál kultivuje priamo z vatového tampónu, obtrite tampón o malú časť povrchu pôdy na okraji misky a potom rozočkujte kľučkami pomocou dvoch čiar.
Táto technika umožňuje izoláciu jednotlivých kolónií z kombinovaných kultúr. Čisté kultúry získané zo samostatných kolónií sú nevyhnutné na identifikačné testy a testy citlivosti izolátov.

V tejto časti je uvedená aj inkubačná teplota a čas.

Je dobrým zvykom v laboratóriu pravidelne kontrolovať momentálnu **teplotu v inkubátoroch**. Teploty nižšie alebo vyššie ako teploty v uvedenom rozsahu môžu spôsobiť stratu životaschopnosti organizmov v kultúrach, zníženie rastu alebo nereprodukovateľné výsledky.
Počas inkubácie pôd pripravených na použite zaistite správnu **vlhkosť**, najmä ak majú predĺženú dobu inkubácie. V tomto prípade sa nesmú používať inkubátory s cirkuláciou vzduchu, pretože by sa mohli pôdy by sa mohli výrazne vysušiť, najmä ak je vlhkosť vzduchu v laboratóriu nízka. Kultúry mikroorganizmov v Petriho miskách, ktoré sú prispôsobené na vlhké prostredie, napr. baktéria *Legionella*, sa musia inkubovať v navlhčených komorách alebo nádobách. Misky sa môžu zalepiť lepiacou páskou, aby sa zredukovalo odparovanie. Minimálna výmena plynov ja však stále možná.
To platí aj pre pôdy v skúmavkách: skrutkovacie uzávery by vždy počas inkubácie mali byť jemne uvoľnené.

Časť **Výsledky** poskytuje informácie o vzhľade organizmov na danej pôde. Pri izolácii a raste na všeobecný účel sa nedá táto špecifická informácia uviesť pri všetkých organizmoch, ktoré na danej pôde rastú. Ďalšie informácie nájdete v príslušnej literatúre.[9]
Špecifické informácie nájdete aj v časti **Výpočet a interpretácia výsledkov**. Táto časť je v dokumente zahrnutá v prípade, že diagnóza závisí od množstva patogénov vo vzorke. Toto napríklad platí pri pôde CLED Agar používanej na určovanie počtu baktérií v moči.

VLASTNOSTI A OBMEDZENIA POSTUPU

Opisujú sa vlastnosti pôdy a kde je to vhodné, sú uvedené aj typy organizmov, ktoré je možné z danej pôdy izolovať, a tiež zdroje dôkazov. Pri pôdach, ktoré boli predstavené len nedávno, môžu byť v tejto časti zahrnuté aj výsledky hodnotenia.

Treba zdôrazniť, že sama pôda je len zriedkavo schopná detekcie všetkých organizmov s možným významom vo vzorke. V rámci mikrobiálnej populácie sa môžu vyskytnúť jednotlivé kmene, ktoré v určitej pôde dobre nerastú napriek tomu, že pôda je vhodná na detekciu väčšiny ďalších kmeňov tohto

druhu. Preto sa pri väčšine vzoriek simultánne očkujú dve alebo tri rôzne pôdy alebo sa kombinuje neselektívna pôda s jednou alebo dvomi selektívnymi pôdami, prípadne sa používajú dve selektívne pôdy s rôznym stupňom selektivity.

V tejto časti sú uvedené aj špecifické známe **obmedzenia aplikácie** tejto pôdy.
Pri väčšine pôd sú na konečnú identifikáciu izolovaných organizmov nevyhnutné ďalšie testy.

POUŽITÁ LITERATÚRA
V tejto časti sa uvádza literatúra použitá v dokumente.

BALENIE/DOSTUPNOSŤ
V tejto časti sú uvedené dostupné katalógové čísla, veľkosti balenia a tam, kde je to možné, aj rôzne formáty.

ĎALŠIE INFORMÁCIE
V tejto časti nájdete ďalšie informácie vrátane adresy výrobcu (symbol pre „továreň“). Nakoniec sú uvedené ochranné známky spomenuté v danom dokumente.

POUŽITÁ LITERATÚRA UVEDENÁ V DOKUMENTE VŠEOBECNÉ POKYNY NA POUŽÍVANIE

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