

## Návod na použitie

**Účel určenia:**

Štandardizované kultivačné médium určené na testovanie antimikrobiálnej citlivosti bakteriálnych druhov *Haemophilus* spp. difúznou diskovou metódou, podľa schválenej normy M2 vydanéj Úradom pre klinické a laboratórne normy (CLSI).

HTM agar 2 je kvalitatívna in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka, určená na pomoc pri liečbe infekčných ochorení. Len na profesionálne použitie.

**Skupina:**

Médium kultivačné tuhé – testy citlivosti

**Princíp:**

Médium HTM agar 2 obsahuje MuellerHintonagar doplnený o NAD (faktor V) a hemín (faktor X), nevyhnutné rastové faktory pre *Haemophilus influenzae*, a kvasničný extrakt. Nízka koncentrácia tymínu-tymidínu v tomto médiu ho dokonale prispôsobuje na testovanie citlivosti rodu *Haemophilus* na trimethoprim-sulfametoxazol. Hlavnou výhodou pôdy HTM 2 v porovnaní s pôdou HTM je optická priehľadnosť umožňujúca merať priemery zón z dna misky podľa štandardného testovacieho postupu pre nenáročných organizmov na pôde MuellerHintonagar.

Interpretačné kritériá pre testovanie citlivosti na antibiotiká sú uvedené v dokumente CLSI M100 (M2), ktorý je súčasťou dokumentu CLSI M2.

**Očakávané výsledky:**

Nameraný priemer vzniknutej inhibičnej zóny na médiu sa vyhodnotí podľa interpretačných kritérií pre priemer inhibičných zón pre citlivé kmene. Výsledkom je stanovenie citlivosti alebo rezistencie naočkovaného kmeňa na príslušné antibiotikum. Interpretačné kritériá pre testovanie citlivosti voči antibiotikám sú uvedené v dokumente komisie CLSI M100 (M2), ktorý je súčasťou dokumentu komisie CLSI M2, prípadne v internom usmernení NRC pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká pri ÚVZ SR v Bratislave. Médium vyhovuje štandardom CLSI.

**Zloženie**

**(v gramoch na liter média):**

Hovädzí extrakt	2
Kyslý hydrolyzátny kazeínu	17,5
Škrob	1,5
Agar	17
Kvasničný extrakt	5
Hematín	0,015
Nikotínamidadenín dinukleotid (NAD)	0,015

**pH:**

7,3 ± 0,1

**Farba:**

Svetlá

**Poskytovaný materiál:**

HTM agar 2 – ready-to-use-medium, vyhotovenie a počet kusov v závislosti od katalógového čísla (Pozrite Dostupné vyhotovenia).

**Požadovaný, ale neposkytovaný materiál:**

Sterilné kľučky, sterilné tampóny, inkubátor, MuellerHinton bujón resp. Fyziologický roztok, generátor CO<sub>2</sub> atmosféry, činidlo na rýchly β-laktamázový test, antimikrobiálne papierové disky, dávkovač diskov, meradlo na zóny

**Typy vzoriek:**

Čistá kultúra izolovaná z klinického materiálu.

HTM agar 2 nie je určený na mikrobiálnu izoláciu priamo z klinických vzoriek. Na výber vhodných antimikrobiálnych látok, ktoré sa majú testovať, je potrebné Gramovo farbenie a predbežná identifikácia baktérií.

**Pracovný postup:**

1.Nechajte platne HTM 2 a disky vytemperovať na izbovú teplotu pred ich použitím.

2.Povrch agaru by mal byť pred použitím suchý. na povrchu agaru alebo vo vnútri viečka by nemali byť viditeľné žiadne kvapky vody. V prípade potreby je možné ich sušiť buď cez noc pri 20 až 25 °C alebo 15 minút pri 35 °C, s odstráneným viečkom Petriho misky. Pozor nepresušiť!

3.Inokulum pripravte z 24 hodinovej kultúry z Čokoládového agaru.

4.Je nutné vykonať rýchly  $\beta$ -laktamázový test pre rýchlu detekciu kmeňov, ktoré sú rezistentné na penicilín, ampicilín alebo amoxicilín.

5.Prípravte si suspenziu testovaného organizmu v živnej pôde MuellerHinton bujón, alebo v 0,9% fyziologickom roztoku. Túto suspenziu je nutné upraviť na zákal s hodnotou 0,5 McFarlandovho štandardu s použitím fotometrického zariadenia. Táto suspenzia bude obsahovať približne 1 – 4 x 10<sup>8</sup> živých zárodokov/ml. Pri príprave tejto suspenzie dávajte pozor, pretože vyššie koncentrácie inokula môžu viesť k falošne rezistentným výsledkom u niektorých  $\beta$ -laktamových antibiotík, najmä v prípadoch testovania kmeňov *H. influenzae* produkujúcich beta-laktamázu.

6.Do 15 minút od úpravy zakalenia ponorte sterilný tampón do riadne rozpusteného inokula a niekoľkokrát ním ráznymi pohybmi otáčajte proti hornej vnútornej stene skúmavky, aby sa vylúčilo nadmerné množstvo tekutiny.

7.Na celý povrch agaruplatneHTM agar 2 trikrát naočkujte inokulumtampónom v troch smeroch zvierajúcich uhol 60° a následne inokulum rozotrite po celej ploche agaru. Nakoniec tampónom obkružte okraj agaru. Pri rozotieraní sa tampón nesmie dotknúť okraja platne, aby sa znížila možnosť vzniku aerosólu.

8.Dávkovač diskov pred použitím premiestnite do izbovej teploty. Disky priložte pomocou dávkovača diskov pevne na povrch naočkovanej agarovej platne do 15 minút od naočkovania. Disky musia byť v tesnom a rovnomernom kontakte s povrchom agaru a po aplikácii sa s nimi nesmie hýbať, pretože počiatočná difúzia antimikrobiálnych látok z diskov je veľmi rýchla. Počas aplikácie diskov dodržujte aseptické bezpečnostné opatrenia.

9.Na jednu miskú položte maximálne 4 disky, a zároveň nie viac ako šesť nasledujúcich diskov: cefalosporíny tretej generácie (napr. cefotaxim, ceftazidím, ceftriaxón, ceftizoxim), aztreonam, imipenem alebo ciproflo.), aby sa zabránilo prekryvaniu zón a interferencii medzi antimikrobiálnymi látkami jednotlivých diskov. Je to dôležité z dôvodu spoľahlivého merania priemerov inhibičných zón.

10.Obráťte Petriho misky, uistite sa, že disky nepadajú z povrchu média a vložte do inkubátora. Inkubujte do 15 minút od aplikácie disku. Ak sú misky ponechané pri izbovej teplote po priložení diskov dlhšie, preddifúzia môže viesť k chybným veľkým zónam inhibície. Inkubujte za podmienok stanovených v časti Podmienky kultivácie – 16 až 18 hodín pri teplote 35 °C v aeróbnej atmosfére s obohatením o 5% oxid uhličitý.

11. Naočkujte miskú s médiom HTM 2 agar kmeňom *H. influenzae* a inkubujte spolu s miskami na testovanie citlivosti na antibiotiká na určenie, či médium podporuje dostatočný rast.

**Odčítanie a interpretácia výsledkov**

Po 16 až 18 hodinách inkubácie misky skontrolujte. Mal by byť prítomný súvislý rast mikroorganizmov. Ak rastú iba izolované kolónie, náter bol príliš slabý a test je nutné opakovať.

Pomocou posuvného meradlaalebo šablóny pripravenej na tento účel zmerajte priemer zón úplnej inhibície vrátane priemeru disku so zaokrúhlením na najbližší

celý milimeter. Meradlo pridržiňte na zadnej časti obrátenej miskynad čiernym svetlo neodrážajúcim pozadím a osvetlením zhora. Za koncový bod treba považovať oblasť, ktorá pri zistení voľným okom nevykazuje zjavný viditeľný rast. Nevšímajte si mierny rast drobných kolónií, ktoré môžete s ťažkosťami spozorovať pri okraji inhibičnej zóny.

Výpočet a interpretácia výsledkov Interpretáciu výsledkov získaných pomocou klinických izolátov *Haemophilus* nájdete v dokumente CLSI M100 (M2).

Výsledky môžu byť označené podľa zistených priemerov ako rezistentné, stredne citlivé alebo citlivé v závislosti od získaných priemerov zón inhibície. Organizmy s pozitívnym testom na produkciu beta-laktamázy je nutné považovať za rezistentné na ampicilín bez ohľadu na získané priemery zón inhibície. Je potrebné poznamenať, že boli popísané kmene *H. influenzae* s chýbajúcou aktivitou  $\beta$ -laktamázy rezistentnej na ampicilín.

Pokiaľ teda priemer zóny inhibície naznačuje rezistenciu na ampicilín, izolát je nutné hlásiť ako rezistentný na tento liek, aj keď bol  $\beta$ -laktamázoý . Kontrolné kultúry je nutné zahrnúť pri každom vykonaní testu citlivosti alebo v týždenných intervaloch, pokiaľ je možné zdokumentovať uspokojivú účinnosť v súlade so štandardom CLSI Standard M2, ktorý obsahuje tabuľky (M100) so správnymi priermi zón inhibície.

K dokumentu CLSI M2 pravidelne vychádzajú informačné dodatky alebo revidované verzie s revidovanými tabuľkami antibakteriálnych terčikov a interpretačných noriem. Pre súčasné odporúčania je nutné použiť najnovšie tabuľky.

**Podmienky kultivácie:** 16 až 18 hodín pri  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , v prostredí obohatenom o 5 % oxidu uhličitého.

**Kontrola kvality:**

Očakávané výsledky rozsahov priemeru inhibičných zón kmeňov kontroly kvality podľa CLSI:		
Kmeň	Antimikrobiálna látka	Rozsah (mm)
<i>Haemophilus influenzae</i> CCM 4456	Ampicilín (10 $\mu\text{g}$ )	13-21
	Ampicilín/sulbactam (10/10 $\mu\text{g}$ )	14-22
	Chloramfenikol(30 $\mu\text{g}$ )	31-40
	Tetracyklín (30 $\mu\text{g}$ )	14-22
	Trimetoprim/sulfametoxazol SXT (1,25 $\mu\text{g}$ /23,75 $\mu\text{g}$ )	24-32
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM4224	Trimetoprim/sulfametoxazol(1,25 $\mu\text{g}$ /23,75 $\mu\text{g}$ )	>20

**Mikrobiologický stav:** Kultivačné médiá spoločnosti Mkb Test a.s. sú naplnené asepticky (najprv prebehne sterilizácia a až následné plnenie do obalov). Pri médiách pripravených týmto spôsobom povoľuje norma STN EN 12322, a následne podľa nej vypracovaný interný štandardný pracovný postup č.4 na hodnotenie sterility, rozsah kontaminácie  $\leq 5\%$ .

**Dodatočná kontrola kvality používateľom:** Všetky vyrobené šarže produktu HTM agar 2 sú uvoľnené do predaja až po vykonaní kontroly kvality v akreditovanom laboratóriu, kde je overená zhoda so špecifikáciami (viď Charakteristika výkonu) a následne je vystavený certifikát kvality – Protokol o skúškach živných pôd.

Je však zodpovednosťou koncového používateľa vykonať test kontroly kvality v súlade s platnými predpismi, v súlade s akreditačnými požiadavkami a skúsenosťami laboratória. Odporúčané kmene sú uvedené v časti Kontrola kvality.

**Charakteristika výkonu:** Pred uvoľnením do predaja súhotové kultivačné médiá otestované pomocou testu

antimikrobiálnej citlivosti difúznou diskovou metódou.

Kontrola citlivosti je vykonaná podľa postupu CLSI s nasledujúcimi kmeňmi a antimikrobiálnymi diskami:

**Haemophilus influenzae CCM 4456** (Ampicilín (10 µg), Ampicilín/sulbactam (10/10µg), Chloramfenikol(30 µg), Tetracyklín (30 µg), Trimetoprim/sulfametoxazol SXT (1,25 µg/23,75 µg))

**Enterococcus faecalis CCM4224** (Trimetoprim + sulfametoxazol(1,25 µg–23,75 µg), Trimetoprim (5 µg))

Po inkubácii 16 až 18 hodín pri  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , v prostredí obohatenom o 5 % oxidu uhličitého súzmerané a zaznamenané inhibičné zóny a následne vyhodnotené v rámci rozsahov kontroly kvality uvádzaných CLSI.

Pred uvoľnením do predaja sú hotové kultivačné médiá a súčasne i dehydrovaný základ testované aj na produktivitu, a to kvantitatívnou metódou, porovnaním výsledkov s predtým schválenou referenčnou šaržou.

Produktivita (Pr) je testovaná referenčnými kmeňmi cieľových mikroorganizmov *Haemophilus influenzae* CCM 4456 a *Enterococcus faecalis* CCM4224, s použitím inokula  $\leq 100$  KTJ.

Ak má kultivačné médium  $Pr \geq 0,7$  (pomer počtu kolónií na testovanom médiu a médiu referenčnom) u cieľových mikroorganizmov, a namerané inhibičné zónysú po kultivácii pri  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  počas 16 až 18 hodín v prostredí obohatenom o 5 % oxidu uhličitého v rámci rozsahov kontroly kvality uvádzaných CLSI, produkt spĺňa deklarovaný výkon.

#### Obmedzenia testu:

- Na získanie interpretovateľných výsledkov je nutné použiť vždy čisté, čerstvé kultúry. Pred prípravou testu citlivosti sa odporúča vykonať Gramovo farbenie a predbežnú identifikáciu izolátu.
- Výsledky môže ovplyvniť celý rad faktorov (veľkosť inokula, skladovanie kultivačných médií a diskov, nesprávny objem/ výška média, pH mimo špecifikácie, vlhkosť, meranie zón, dĺžka inkubácie, inkubačná atmosféra atď.). Na zabezpečenie spoľahlivých výsledkov je preto potrebné prísne dodržiavať protokol.
- Nesprávna koncentrácia očkovej inokula môže viesť k chybným výsledkom. Ak je inokulum príliš silné, inhibičné zóny môžu byť príliš malé a naopak, ak je inokulum príliš slabé, môžu byť príliš veľké a ťažko merateľné.
- Nevhodné uskladnenie antibiotických diskov môže spôsobiť stratu účinnosti a nesprávny výsledok testu rezistencie.
- U niektorých kombinácií organizmov a antibakteriálnych látok nemusí mať zóna inhibície ostro ohraničený okraj, čo môže viesť k nesprávnej interpretácii.
- Pokyny pre interpretáciu výsledkov nájdete v odkazoch na literatúru.
- Citlivosť organizmu na špecifické antibiotikum in vitro nemusí nevyhnutne znamenať, že antibiotikum bude účinné in vivo
- Toto kultivačné médium je určené na pomoc pri liečbe infekčných ochorení; musí sa vykonať interpretácia výsledkov berúc do úvahy klinickú anamnézu pacienta, pôvod vzorky a výsledky iných diagnostických testov.

#### Stabilita:

Kultivačné médium je pri dodržaní odporúčaných skladovacích podmienok stabilné 3 mesiace odo dňa výroby.

Médium sa môže očkovať až do dátumu expirácie a inkubovať po odporúčanú dobu inkubácie. Dátum expirácie je uvedený na výrobku, na štítku výrobku a vo výstupnom certifikáte výrobku.

Po otvorení originálneho obalu spotrebovať do 24 hod.

Kat.číslo:  
MKM02016

## HTM agar 2

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



### Skladovanie:

pri +2 až +8 °C, v tme, v originálnom balení.

Zabrániť prehriatiu alebo premrznutiu výrobku. Zmrazenie môže poškodiť gélovú konzistenciu tuhých médií a dlhodobejšie skladovanie pri vyššej ako odporúčanej teplote môže znehodnotiť zložky kultivačného média, čo ovplyvní výkon a stabilitu média.

Zabrániť extrémnym a/ alebo opakovaným výkyvom teploty, čo má za následok vznik prílišnej vlhkosti v Petriho miskách.

Zabezpečiť uloženie a skladovanie v smere šípky  $\uparrow\uparrow$  na vonkajšom obale, v opačnom prípade môže nastať znehodnotenie výrobku.

V prípade vystavenia kultivačných médií umelému osvetleniu, slnečnému žiareniu alebo UV žiareniu počas dlhšej doby, môže sa znížiť ich výkonnosť.

### Likvidácia:

Použité a nepoužité, či kontaminované produkty likvidovať ako NEBEZPEČNÝ odpad v zmysle platných legislatívnych predpisov a interných postupov.

### Bezpečnostné a varovania:

#### upozornenia

HTM agar 2 je in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka určená na kvalitatívnu diagnostiku. Nie je automatizovaná a nie je určená na sprievodnú diagnostiku.

Len na profesionálne použitie, a to primerane vyškoleným a kvalifikovaným laboratórnym personálom, ktorý dodržiava schválené preventívne opatrenia pre biologické nebezpečenstvo a aseptické techniky práce.

Pri manipulácii so vzorkami a výrobkami postupovať asepticky, za použitia primeraných ochranných prostriedkov v súlade s určeným účelom použitia. Dodržiavať zásady bezpečnosti práce a hygieny.

Všetky vzorky a výrobky po inokulácii sú považované za potenciálne INFEKČNÉ.

Médium nie je klasifikované ako nebezpečné podľa smernice (ES) č.1272/2008.

Médium môže obsahovať suroviny živočíšneho pôvodu. Napriek ante a post mortem kontrole zvierat počas výrobného a distribučného cyklu surovín u výrobcu základu a aditív, nie je možné úplne zaručiť, že média neobsahujú žiadny prenosný patogén. Z tohto dôvodu je potrebné zaobchádzať s produktami ako s potenciálne infekčnými a manipulovať s nimi podľa štandardných opatrení (zamedziť požitiu, vdychnutiu a kontaktu s pokožkou, očami a sliznicami . atď.)

Kultivačné média spoločnosti Mkb Test a.s. sa nepovažujú za sterilný produkt, ale za produkt s kontrolovanou biologickou kontamináciou v medziach určených normou STN EN 12322 a štandardným pracovným postupom (ŠPP) č.4.

IVD diagnostická zdravotnícka pomôcka **len na jedno použitie**.

Akákoľvek zmena alebo úprava odporúčaných podmienok kultivácie, pracovného postupu, typu vzoriek, počtu použitých čipov alebo počtu testov, ako udáva výrobca môže ovplyvniť výkon tejto in vitro diagnostickej zdravotníckej pomôcky.

Nepoužívať výrobky po uplynutí doby expirácie.

Nepoužívať výrobky, ktoré vykazujú známky mikrobiálnej kontaminácie, vysušenia, mechanického poškodenia (poškodený vrchný obal alebo ochranné fólie, prasknutie atď.), zmeny farby, nadbytočnú vlhkosť alebo preukazujú iné nedostatky.

Informácie použité v tomto dokumente boli definované podľa našich najlepších

<b>Kat.číslo:</b> <b>MKM02016</b>	<h1>HTM agar 2</h1> <p>In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka          Len na profesionálne použitie</p>	
--------------------------------------	--	--

vedomostí a schopností, a predstavujú návod na použitie produktu. Nami uvedené informácie nezbavujú koncového používateľa zodpovednosti za kontrolu vhodnosti produktu HTM agar 2 na zamýšľaný účel. Vždy musia byť sledované a dodržiavané platné zákony, nariadenia a štandardné postupy pri manipulácii so vzorkami.

V prípade zistenia poškodenia, nehody s deklarovaným výkonom a iných nedostatkov tejto in vitro diagnostickej zdravotníckej pomôcky hlásiť okamžite po zistení výrobcovi na e-mailovú adresu [obchod@mkbtest.sk](mailto:obchod@mkbtest.sk). v prípade závažnej nehody spôsobenej pomôckou, hlásiť túto udalosť príslušným orgánom a výrobcovi na vyššie uvedenú adresu.

**Dostupné vyhotovenia:**

Kat. č.	Vyhotovenie	Doplňujúce označenie	Balenie
MKM02016-005	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	5 ks
MKM 02016-010	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	10 ks
MKM 02016-020	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	20 ks
MKM 02016-120	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	120 ks

**Použité symboly na vonkajšom obale:**

 Katalógové číslo	 Číslo šarže	 In vitro diagnostická pomôcka	 Výrobca	 Dátum trvanlivosti	 Európska zhoda	 Krehké, zaobchádzajte opatrne
 Teplotný limit	 Obsah postačuje na <n> testov	 Pozri Návod na použitie	 Len na jedno použitie	 Uchovávajte mimo slnečného svetla	 Jedinečný identifikátor pomôcky	 Týmto smerom nahor

**Použitá literatúra:**

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Approved standard: M2. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI, Wayne, PA, USA. Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
2. Interné smernenie NRC pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká pri ÚVZ SR v Bratislave.
3. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9194>[03.11.2021]
4. [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco\\_BBL/211438.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211438.pdf) [03.11.2021]

**Výrobca:**

**MkB Test a.s.**  
**Rosina 169**  
**013 22 Rosina**  
**Slovenská republika**  
**Tel: (+421) 41 500 3555**  
**[www.mkbtest.sk](http://www.mkbtest.sk)**

**Kat.číslo:  
MKM02016**

## **HTM agar 2**

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



**Revízie:**

<b>Verzia</b>	<b>Revízia č.</b>	<b>Zmena</b>	<b>Dátum</b>
2	1	Kontrola pred hlásením IVD ZP na ŠÚKL	23.07.2018
	2	Aktualizácia a doplnenie obsahu v súlade s IVDR 2017/746	03.11.2021
	3.	Doplnenie Charakteristiky výkonu Doplnenie účelu určenia o informáciu HTM agar 2 je kvalitatívna in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka, určená len na profesionálne použitie.	13.12.2021
	4	Aktualizácia a doplnenie údajov v časti: Účel určenia, Charakteristika výkonu Bezpečnostné upozornenia a varovania	22.05.2023