

## Návod na použitie

**Účel určenia:** Kultivačné médium určené na stanovenie citlivosti druhov *Candida* voči triazolovým antimykotikám (fluconazol, voriconazol) diskovým difúznym testom.

Mueller Hinton agar s 2% glukózy je kvalitatívna in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka, určená na pomoc pri liečbe infekčných ochorení. Len na profesionálne použitie.

**Alternatívny názov:** Mueller Hinton s 2% glukózy a MB

**Skupina:** Médium kultivačné tuhé – testy citlivosti

**Princíp:** Médium Mueller Hinton agar s 2% glukózy obsahuje Mueller Hinton agar, ktorý je doplnený glukózou na konečnú koncentráciu 2% a tým poskytuje vhodné podmienky pre rast kvasiniek. Prídavok metylénovej modrej na konečnú koncentráciu 0,5 µg / ml zlepšuje odčítanie okraja inhibičnej zóny. Médium odporúča CLSI na testovanie antimykotickej senzitivity mikroorganizmov pomocou Kirby-Bauerovej diskovej difúznej metódy.

Pri tejto metóde sa po celej ploche povrchu média naočkuje štandardizovaná suspenzia organizmu. Papierové disky napustené špecifickým množstvom antimykotík sa potom umiestnia na povrch média, platňa sa inkubuje a merajú sa inhibičné zóny okolo každého disku. Nameraný priemer vzniknutej inhibičnej zóny na médiu sa vyhodnotí podľa interpretačných kritérií o priemere inhibičných zón pre citlivé kmene. Výsledkom je stanovenie citlivosti alebo rezistencie naočkovaného kmeňa na príslušné antimykotikum. Interpretačné kritériá pre testovanie citlivosti voči antimykotikám sú uvedené v dokumente komisie CLSI.

**Očakávané výsledky:** Nameraný priemer vzniknutej inhibičnej zóny na médiu sa vyhodnotí podľa interpretačných kritérií o priemere inhibičných zón pre citlivé kmene. Výsledkom je stanovenie citlivosti alebo rezistencie naočkovaného kmeňa na príslušné antimykotikum. Interpretačné kritériá pre testovanie citlivosti voči antimykotikám sú uvedené v dokumente komisie CLSI, ako i v internom usmernení NRC pre sledovanie rezistencie mikroorganizmov na antibiotiká pri ÚVZ SR v Bratislave.

**Zloženie  
(v gramoch na liter média):**

Hovädzí extrakt	2
Kyslý hydrolyzát kazeínu	17,5
Škrob	1,5
Agar	17
Glukóza	20
Metylénová modrá	0,0005

**pH:** 7,3 ±0,1

**Farba:** Nazelenaná

**Poskytovaný materiál:** Mueller Hinton agar s 2% glukózy – ready-to-use-medium, vyhotovenie a počet kusov v závislosti od katalógového čísla (Pozrite Dostupné vyhotovenia).

**Požadovaný, ale neposkytovaný materiál:** Sterilné kľučky, sterilné tampóny, Fyziologický roztok, inkubátor, antimikrobiálne papierové disky, dávkovač diskov, meradlo na zóny

**Typy vzoriek:** Čistá kultúra izolovaná z klinického materiálu.

Mueller Hinton Agar s 2% glukózy nie je určený na mikrobiálnu izoláciu priamo z klinických vzoriek.

## Pracovný postup č.1 (kultivačné médium v Petriho miske):

1.Nechajte platne Mueller hinton agar s 5% glukózy 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.Pripravte inokulum z 24 hodinových kultúr vyrastených na platni s neselektívnym Sabouraud agarom. Kolónie preneste do Fyziologického roztoku a premiešajte do rovnomerného zálaku. Upravte hustotu suspenzie organizmov na 0,5 McFarlanda pridaním fyziologického roztoku alebo viac kolónií baktérií.

4.Ponorte sterilný vatový tampón do dostatočne zriedenej očkovacej kultúry do 15 minút od úpravy zálaku a silno ním niekoľkokrát zakrúžte proti hornej vnútornej stene skúmavky, aby sa vytlačila nadbytočná tekutina.

5.Na celý povrch agaru platne Mueller Hinton agar s 2% glukózy trikrát naočkujte inokulum tampónom 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 aerosolu

6.Hneď ako sa inokulum absorbuje a povrch agaru je suchý (maximálne však do 15 minút), naneste antimykotické disky. Disky by sa mali umiestniť na agarovú platňu tak, aby nedochádzalo k prekryvaniu inhibičných zón, maximálne 4 ks diskov na jednu platňu.

7.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.

8.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 – 24 až 48 hodín pri 35 ±2°C ,aeróbne

## Odčítanie a interpretácia výsledkov

Po inkubácii by mal byť prítomný súvislý rast mikroorganizmov. Ak rastú iba izolované kolónie, náter bol príliš slabý a test je nutné opakovať.

Zmerajte priemer zón úplnej inhibície vrátane priemeru disku pri zaokrúhlení na celé milimetre použitím posuvných meradiel. 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.

Interpretujte priemery zón podľa tabuliek hraničných hodnôt (CSLI). Výsledky získané so špecifickými organizmami je následne možné hlásiť ako rezistentné alebo citlivé.

Kat.číslo:  
MKM 02021  
MKM 10253

# Mueller Hinton agar s 2% glukózy

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



## Pracovný postup č.2 (kultivačné médium vo fľaši):

Pevné kultivačné média dodávané vo fľaši rozohriať vo vodnom kúpeli (pri 100 °C), a to 20 až 30 min, s pootvoreným uzáverom, ponorené až do výšky agaru. Odporúčame označiť si uzáver fľaše pred vloženíím do vodného kúpeľa. Médium následne ochladiť a rozplniť po 25 ml do požadovaných nosičov - Petriho misky, resp. skúmavky. Následne pokračovať spôsobom udaným v Pracovný postup č.1.

Pre metódu zaliatia vzorky nechať agar ochladiť na 45-50 °C, zaliať vzorku vo vhodnom nosiči, opatrne premiešať a inkubovať za podmienok viď. PODMIENKY INKUBÁCIE.

Na určenie izolovaných kolónií je nutné použiť ďalšie identifikačné metódy.

Médium sa nesmie prehrievať a rozohrievať opakovane.

Za výber vhodného inkubačného času, teploty a atmosféry v závislosti od spracovanej vzorky, od požiadaviek organizmov, ktoré majú byť izolované, a od lokálnych platných predpisov je zodpovedný používateľ.

## Podmienky kultivácie

24 až 48 hodín pri 35 ±2°C ,aeróbne

## Kontrola kvality:

Očakávané výsledky rozsahov priemeru inhibičných zón kmeňa kontroly kvality podľa CLSI:		
Kmeň	Antimykotická látka	Rozsah (mm)
<i>Candida albicans</i> CCM 8261	Flukonazol (25 µg)	32 - 43
	Vorikonazol (1 µg)	31 - 42

## 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 ≤ 5%.

## Dodatočná kontrola kvality používateľom:

Všetky vyrobené šarže produktu Mueller Hinton agar s 2% glukózy 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 sú hotové kultivačné média otestované pomocou testu antimykoticej citlivosti difúznou diskovou metódou, a to referenčným kmeňom *Candida albicans* CCM 8261 a antimykotickými diskami Flukonazol (25 µg) a Vorikonazol (1 µg) Po inkubácii pri 25 až 30 °C počas 48 až 72 hodín za aeróbných podmienok, sú zamerané a zaznamenané inhibičné zóny a následne sú 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 porovnaním výsledkov s predtým schválenou referenčnou šaržou.

Produktivita (Pr) je testovaná referenčným kmeňom cieľového mikroorganizmu *Candida albicans* CCM 8261, s použitím inokula ≤ 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 zóny sú v rámci rozsahov kontroly kvality uvádzaných CLSI, po kultivácii pri 25 až 30°C počas

24 až 48 hodín v aeróbnej atmosfére, výsledky sa považujú za prijateľné a v súlade so špecifikáciami. Produkt spĺňa deklarovaný výkon.

## Obmedzenia testu:

- Na získanie interpretovateľných výsledkov je nutné použiť vždy čisté, čerstvé kultúry.
- 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. (CLSI a interné usmernenia).
- Médium sa môže používať výhradne 5-fluorocytosín, flukonazol, vorikonazol – diskovou difúznou metódou.
- Nesprávna koncentrácia 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.
- U niektorých kombinácií mikroorganizmov a antimikrobiálnych látok nemusí mať zóna inhibície ostro ohraničený okraj, čo môže viesť k nesprávnej interpretácii.
- Nevhodné uskladnenie antimykotických diskov môže spôsobiť stratu účinnosti a nesprávny výsledok testu rezistencie.
- Citlivosť organizmu na špecifickú antimikrobiálnu látku 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 5 mesiacov (v Petriho miske) a 3 mesiace (vo fľaške) 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.

## 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 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  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:

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

## Bezpečnostné a varovania:

### upozornenia

Mueller Hinton agar s 2% glukózy je in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka určená na kvalitatívnu diagnostiku. Nie je automatizovaná a nie je určená na sprievodnú diagnostiku.

Kat.číslo:  
MKM 02021  
MKM 10253

# Mueller Hinton agar s 2% glukózy

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



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 použití či 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 vedomostí a schopností, a predstavujú návod na použitie produktu. Nami uvedené informácie nezbavujú koncového používateľa zodpovednosti za kontrolu vhodnosti produktu Mueller Hinton agar s 2% glukózy 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
MKM 02021-005	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	5 ks
MKM 02021-010	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	10 ks
MKM 02021-020	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	20 ks
MKM 02021-120	Petriho miska 90 mm, 18 ml (PM90)	-	120 ks
MKM 10253-001	Fľaša (500 ml)	500 ml	1 ks

Kat.číslo:  
MKM 02021  
MKM 10253

# Mueller Hinton agar s 2% glukózy

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



## Použité symboly na vonkajšom obale:

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

## Použitá literatúra:

1. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of yeasts; Approved Guideline Second Edition M44-A2 Vol.24 No.17
2. <https://himedialabs.com/TD/M1825.pdf> [02.11.2021]
3. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8982> [02.11.2021]
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) [02.11.2021]

## Výrobca:

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

## Revízie:

Verzia	Revízia č.	Zmena	Dátum
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 Mueller Hinton agar s 2% glukózy 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