

Návod na použitie

Účel určenia:

Kultivačné médium určené na stanovenie citlivosti mikroorganizmov na antimykotiká 5 fluorocytosín, flukonazol, vorikonazol diskovou difúznou metódou.

RPMI agar 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:

RPMI je neselektívne a nediferenciálne kultivačné médium, ktoré sa bežne používa na testovanie citlivosti na antimykotiká pomocou Kirby-Bauerovej diskovej difúznej metódy. Odporúča sa na difúziu antimykotických látok impregnovaných na papierovom disku cez agarový gél, ako je opísané v štandarde schválenom CLSI.

Médium obsahuje vitamíny, aminokyseliny, soli, indikátor pH a je široko používaný pre bunkové kultúry. Prídavok MOPS pufru zabezpečuje stabilitu pH v médiu.

Očakávané výsledky:

Disková difúzna metóda: 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):

1/ suplement RPMI 1640	8,4
MOPS Buffer	34,5
H2O	450 ml
2/ Bacto agar	15
D-glukóza	20
H2O	500 ml
1N NaOH	90 ml

pH:

7,0 ±0,1

Farba:

Ružová

Poskytovaný materiál:

RPMI agar – 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, antimikrobiálne papierové disky, dávkovač diskov, meradlo na zóny, prípadne prúžky s obsahom exponenciálneho gradientu antimykotických látok.

Typy vzoriek:

Čistá kultúra izolovaná z klinického materiálu.

RPMI agar nie je určený na mikrobiálnu izoláciu priamo z klinických vzoriek.

Pracovný postup:

1.Nechajte platne RPMI agar 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 20-25 °C alebo 15 minút pri 35 °C, s odstráneným viečkom Petriho misky. Pozor nepresušiť!

3.Pripravte si inokulum:

Inokulum pre kvasinky: suspenzia vo fyziologickom roztoku do 0,5 McFarland pre *Candida spp.* a 1 McFarland pre *C. neoformans*.

Inokulum pre plesne: suspenzia konídií aj hýf (zrelý rast 5-7 dní) vo fyziologickom roztoku s Tweenom na 0,5 McFarland pre *Aspergillus spp.* a 1 McFarland pre *Fusarium* a *Rhizopus spp.*

Na získanie interpretovateľných výsledkov je nutné použiť vždy čerstvé kultúry.

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

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

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. Maximálny 4 ks diskov na 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, predifúzia môže viesť k chybným veľkým zónam inhibície. Inkubujte za podmienok stanovených v časti Podmienky kultivácie.

9. Pokyny pre inkubáciu:

Kvasinky: 35 °C na vzduchu počas 24 až 48 hodín pre *Candida spp.* a 48 až 72 hodín pre *C. neoformans*.

Aspergillus spp.: 35 °C počas 18 až 24 hodín;

Fusarium spp.: 35 °C/24 až 48 hodín, potom teplota miestnosti počas 24 až 48 hodín;

Rhizopus spp.: 35 °C počas 18 až 24 hodín

Pri iných rodoch predĺžte inkubačný čas podľa potreby, denne kontrolujte misky, či sa v nich nevytvorila čitateľná inhibičná zóna v tvare elipsy.

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.

Disková difúzna metóda:

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

Za hraničný (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.

Podmienky kultivácie:

24 až 48 hodín pri 30 až 35°C, aeróbne

Kat.číslo:
MKM 02024

RPMI agar

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka
Len na profesionálne použitie



Kontrola kvality:

Očakávané výsledky rozsahov priemeru inhibičných zón:		
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 RPMI 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 je hotové kultivačné médium otestované pomocou testu antimykoticej citlivosti difúznou diskovou metódou kmeňom *Candida albicans* CCM 8261 a antimykotickými diskami Flukonazol (25 µg), Vorikonazol(1 µg). Po inkubácii 48 hodín pri 30 až 35°C, za aeróbnych podmienok sú zmerané 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 kvantitatívnou metódou, porovnaním výsledkov s predtým schválenou referenčnou šaržou.

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- fluorocytozín, flukonazol, vorikonazol – diskovou difúznou metódou, tiež na stanovenie hodnoty MIC pre rôzne antifungálne látky, antimykotiká metódou E testu. Pri hodnotení je nutné dodržiavať usmernenia v príbalovom letáku pre antimykotický E-test citlivosti podľa výrobcu.
- 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 antibiotických 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.
- Odčítanie a interpretácia vyžadujú odborné znalosti a dôsledné dodržiavanie pokynov výrobcu gradientových pásov; môžu nastať problémy, keď neskúsení užívatelia nesprávne interpretujú slabý rast pozadia malých kolónií v rámci zón.
- RPMI agar sa môže použiť na stanovenie MIC s prúžkami obsahujúcimi antimikrobiálne gradienty. Ak chcete vykonať test touto metódou je potrebné dodržiavať návod na použitie dodávateľa prúžkov a validovať pracovný postup v laboratóriu
- 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 4 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.

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 \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:

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

Bezpečnostné a varovania:

upozornenia

RPMI agar 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.

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 nezavádzajú konečného používateľa zodpovednosti za kontrolu vhodnosti produktu RPMI agar 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 deklarovávaným výkonom a iných nedostatkov tejto in vitro diagnostickej zdravotníckej pomôcky hlásiť okamžite po zistení výrobcovi na e-mailovú adresu 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 02024-005	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	5 ks
MKM 02024-010	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	10 ks
MKM 02024-020	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	20 ks
MKM 02024-120	Petriho miska 90 mm, 25 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. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008
- 2.Arendrup MC et al. EUCAST definitive document E.7.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Valid from 22 April, 2020

**Kat.číslo:
MKM 02024**

RPMI agar

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka
Len na profesionálne použitie



Výrobca:

MkB Test a.s.
Rosina 169
013 22 Rosina
Slovenská republika
Tel: (+421) 41 500 3555
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	05.11.2021
	3	Doplnenie Charakteristiky výkonu Doplnenie účelu určenia o informáciu RPMI agar je kvalitatívna in vitro diagnostická pomôcka, určená len na profesionálne použitie.	07.02.2022
	4	Aktualizácia a doplnenie údajov v časti: Účel určenia, Charakteristika výkonu Bezpečnostné upozornenia a varovania	22.05.2023