

## Návod na použitie

**Účel určenia:**

Kultivačné médium určené na testovanie antimikrobiálnej citlivosti *Haemophilus spp.*, *Streptococcus spp.* a ďalších rastovo náročných mikroorganizmov z klinických vzoriek difúznou diskovou metódou.

Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD je kvalitatívna in vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka, určená na pomoc pri liečbe infekčných ochorení. Len na profesionálne použitie.

**Alternatívny názov:**

Mueller Hinton agar s konskou krvou

**Skupina:**

Médium kultivačné tuhé – testy citlivosti

**Princíp:**

Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD je neselektívne a nediferenciálne kultivačné médium. Tvorí ho Mueller Hinton agar, ktorý je obohatený prídavkom konskej krvi a  $\beta$ -NAD. Defibrinovaná konská krv a  $\beta$ -NAD umožňujú rast náročných baktérií s minimálnym zásahom do výsledkov testov citlivosti na antimikrobiálne látky. Médium odporúča a standardizuje EUCAST pre testovanie náročných organizmov, ako sú *Streptococcus pneumoniae*, streptokoky skupiny Viridans, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni* a *coli*, *Corynebacterium spp.*, *Aerococcus sanguinicola* a *urinae*, *Kingella kingae*, *Aeromonas spp.*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni* a *coli*.

Postup testu antimikrobiálnej citlivosti je založený naj Kirby-Bauerovej metóde. Pri tejto metóde sa po celej ploche povrchu média naočkuje štandardizovaná suspenzia organizmu. Papierové disky napustené špecifickým množstvom antimikrobiálnych látok sa potom umiestnia na povrch média, platňa sa inkubuje a merajú sa inhibičné zóny okolo každého disku. Určenie, či je organizmus citlivý alebo rezistentný na danú látku, sa vykonáva na základe porovnania veľkostí získaných inhibičných zón s veľkosťami uvedenými v tabuľkách zlomových bodov EUCAST.

**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 antibiotikum.

Médium vyhovuje odporúčeniu EUCAST.

**Zloženie  
(v g na liter média):**

Hovädzí extrakt	2
Kyslý hydrolyzát kazeínu	17,5
Škrob	1,5
Agar	17
Defibrinovaná konská krv	50 ml
$\beta$ -NAD	20 mg

**pH:**

7,2 – 7,4

**Farba:**

Červená

**Poskytovaný materiál:**

Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD – 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, generátor CO<sub>2</sub> atmosféry, pomocné kultivačné média, antimikrobiálne papierové disky, dávkovač diskov, meradlo na zóny

**Typy vzoriek:**

Čistá kultúra izolovaná z klinického materiálu.

Mueller Hinton Agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD 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.

EUCAST publikoval metódu rýchlej AST (odčítanie po 4, 6 alebo 8 hodinách inkubácie) priamo z fliaš s pozitívnou hemokultúrou, overenú na vybrané organizmy; postup testu, čítanie a interpretáciu inhibičných zón nájdete v dokumente EUCAST.

#### Pracovný postup:

1. Nechajte platne Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD 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 suspenzie mikroorganizmov

Používajte vždy čerstvé testovacie suspenzie pripravené z 24 hodinových kultúr z platní s Columbia krvným agarom. Kolónie preneste do Fyziologického roztoku a premiešajte do rovnomerného zákalu. Použite niekoľko morfológicky podobných kolónií, aby sa predišlo výberu atypického variantu. Upravte hustotu suspenzie organizmov na 0,5 McFarlanda pridaním fyziologického roztoku alebo viac kolónií baktérií. Inokulum použite ideálne počas nasledujúcich 15 minút.

V prípade, že suspenzia *Streptococcus pneumoniae* bola vytvorená z 24 hodinových kultúr platní s Čokoládovým agarom, jej hustota musí byť ekvivalentná štandardu 1,0 McFarland.

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 Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD 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 aerosólu.

6. Dávkočiar diskov pred použitím premiestnite do izbovej teploty. Disky priložte pomocou dávkočiar 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.

7. Na jednu misku použite maximálne 6 ks diskov, aby sa zabránilo prekryvaniu zón a interferencii medzi antimikrobiálnymi látkami jednotlivých diskov. Je to dôležité z dôvodu spoľahlivého merania priemerov inhibičných zón.

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 – pri teplote 35 ± 1 °C, 5 % CO<sub>2</sub> počas 16-20 hodín.

#### Odčítanie a interpretácia výsledkov

Po inkubácii by mal byť viditeľný súvislý rast mikroorganizmov. Ak rastú iba izolované kolónie, očkovacia kultúra bola príliš slabá a test treba zopakovať.

Pomocou posuvného meradla alebo pravítka zmerajte priemer zón úplnej inhibície vrátane priemeru disku na najbližší celý milimeter. Misku pridržte s odstráneným viečkom vo vzdialenosti približne 30 cm od oka. Za koncový bod je potrebné považovať oblasť, ktorá nevykazuje žiaden rast viditeľný voľným okom. Nevšímajte si mierny rast drobných kolónií, ktoré môžete s ťažkosťami spozorovať pri okraji inhibičnej zóny

Pre hemolytické streptokoky odčítajte inhibíciu rastu a nie inhibíciu hemolýzy.  $\beta$ -hemolýza je zvyčajne bez rastu, zatiaľ čo  $\alpha$ -hemolýza a rast sa zvyčajne zhodujú. Ak narazíte na dvojité zóny, zmerajte vnútornú zónu (ak nie je špecificky uvedené inak).

Interpretujte priemery zón do kategórií citlivosti podľa aktuálnych tabuliek v súlade s hraničnými hodnotami. Výsledky získané u konkrétnych organizmov je možné následne hlásiť ako rezistentné, alebo citlivé. Ďalšie informácie o špecifických vlastnostiach rastu, interpretácii a ďalších metodických pokynoch sa aktuálne na EUCAST.

**Podmienky kultivácie:** 16 až 20 hodín pri 35±1°C, v atmosfére s 5% CO<sub>2</sub>

#### Kontrola kvality

Očakávané výsledky rozsahov priemerov inhibičných zón kmeňov kontroly kvality podľa EUCAST:		
Kmeň	Antimikrobiálna látka	Rozsah (mm)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CCM 4501	Cefuroxim (30 µg)	28-34
	Erytromycín (15 µg)	26-32
	Ofloxacin (5 µg)	18-24
	Trimetoprim-sulfametoxazol(1,25 µg + 23,75 µg)	18-26
<i>Haemophilus influenzae</i> CCM 4457	Cefuroxim (30 µg)	26-34
	Erytromycín (15 µg)	10-16
	Ofloxacin (5 µg)	31-37
	Trimetoprim-sulfametoxazol(1,25 µg + 23,75 µg)	27-35

**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 konskou krvou a  $\beta$ -NAD 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 médiá a súčasne i dehydrovaný základ otestované pomocou testu antimikrobiálnej citlivosti difúznou diskovou metódou a taktiež na produktivitu, a to porovnaním výsledkov s predtým schválenou referenčnou šaržou.

Kontrola citlivosti je vykonaná podľa postupu EUCAST referenčnými kmeňmi a antibiotickými diskami:

*Streptococcus pneumoniae* CCM 4501 Cefuroxim (30  $\mu$ g), Erytromycín (15  $\mu$ g), Ofloxacin (5  $\mu$ g), Trimetoprim-sulfametoxazol(1,25  $\mu$ g–23,75  $\mu$ g)

*Haemophilus influenzae* CCM 4457 (Cefuroxim (30  $\mu$ g), Erytromycín (15  $\mu$ g), Ofloxacin (5  $\mu$ g), Trimetoprim-sulfametoxazol(1,25  $\mu$ g–23,75  $\mu$ g))

Po inkubácii pri 35 $\pm$ 1°C počas 16 až 20 hodín v atmosfére s 5% CO<sub>2</sub> sú zmerané a zaznamenané inhibičné zóny a následne sú vyhodnotené v rámci rozsahov kontroly kvality uvádzaných EUCAST.

Produktivita (Pr) je testovaná referenčnými kmeňmi cieľových mikroorganizmov - *Streptococcus pneumoniae* CCM 4501 a *Haemophilus influenzae* CCM 4457, s použitím inokula  $\leq$  100 KTJ.

Po inkubácii pri 35 až 37°C počas 18 až 24 hodín v atmosfére s 5% CO<sub>2</sub> sa vyhodnotí a zaznamená rast. Všetky kmene musia vykazovať dobrý rast.

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 EUCAST, po inkubácii pri 35 $\pm$ 1°C počas 16 až 20 hodín v atmosfére s 5% CO<sub>2</sub>, 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. 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.
- Štúdia EUCAST, pri ktorej sa hodnotila účinnosť disku 16 strategicky dôležitých antibiotických diskov od deviatich výrobcov diskov pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti odhalila, že nie všetky sú rovnakej kvality. Je preto zodpovednosťou laboratórií vykonávať kontrolu kvality, aby sa zaručilo, že použitý materiál spĺňa štandardy laboratória
- Inhibičná zóna pri niektorých kombináciách organizmov a antimikrobiálnych látok nemusí mať ostro ohraničený okraj, čo môže viesť k nesprávnej interpretácii (Podrobné informácie nájdete v príručke na odčítanie) EUCAST
- 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. Preto sa dôrazne odporúča riadiť sa EUCAST - pokynmi na manipuláciu s inokulom a naočkovanými platňami, aby sa minimalizovalo potenciálne riziko nesprávnych výsledkov v dôsledku nesprávnej manipulácie.
- 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.
- In vitro citlivosť organizmu na špecifické antimikrobiálne činidlo nevyhnutne neznamená, že činidlo bude účinné in vivo.
- Napriek prítomnosti konskej krvi a B-NAD niektoré náročné kmene nemusia na médiu rásť alebo len veľmi slabo.
- Podrobnosti o metodológii diskovej difúzie, čítaní a interpretácii inhibičných zón, varovania, ako aj usmernenia pre testovanie citlivosti, usmernenia pre detekciu mechanizmov rezistencie, klinické hraničné hodnoty nájdete v dokumentoch EUCAST.
- Mueller Hinton agar s krvou sa môže použiť na stanovenie MIC s prúžkami obsahujúcimi antimikrobiálne gradienty. Ak chcete vykonať test touto metódou je potrebné dodržiavať návod na použitie dodávateľa stripov a validovať pracovný postup v laboratóriu. Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD
- 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 52 dní odo dňa výroby.

Kat.číslo:  
MKM 02031

## Mueller Hinton agar s konskou krvou a $\beta$ -NAD

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



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 znížiť 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:

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

### Bezpečnostné a varovania:

#### upozornenia

Mueller Hinton agar s konskou krvou a  $\beta$ -NAD 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, vdýchnutiu 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 diagnostické zdravotníckej pomôcky.

Nepoužívať výrobky po uplynutí doby expirácie.

Kat.číslo:  
MKM 02031

# Mueller Hinton agar s konskou krvou a $\beta$ -NAD

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



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 konskou krvou a  $\beta$ -NAD agar na zamýšľaný účel. Vždy musia byť sledované a dodržiavané platné zákony, nariadenia a štandardné postupy pri manipulácii so vzorkami.

V prípade zistenia poškodenia, nezhody s deklarovávaným 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 02031-005	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	5 ks
MKM 02031-010	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	10 ks
MKM 02031-020	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	20 ks
MKM 02031-120	Petriho miska 90 mm, 25 ml (PM90)	-	120 ks

## Použité symboly na vonkajšom obale:

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

## Použitá literatúra:

1. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>
2. EUCAST Disk Difusion Method for Antimikrobiaľ Susceptibility Testing. Najnovšiu verziu nájdete na stránke <http://www.eucast.org>
3. <https://www.bd.com/resource.aspx?id=35101>
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
5. [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)**

Kat.číslo:  
MKM 02031

# Mueller Hinton agar s konskou krvou a $\beta$ -NAD

In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka  
Len na profesionálne použitie



## 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 Mueller Hinton agar s konskou krvou a $\beta$ -NAD je kvalitatívna in vitro diagnostická zdravotnícka 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