

CHOCOLATE AGAR

INSTRUKCJA UŻYWANIA GOTOWEGO PODŁOŻA NA PŁYTCE

1. Przeznaczenie

Chocolate Agar jest podłożem nieselektywnym używanym do jakościowego wykrywania i izolacji drobnoustrojów patogennych o wysokich wymaganiach odżywczych, w szczególności bakterii z rodzajów *Neisseria* i *Haemophilus* w próbkach materiałów klinicznych pochodzących od człowieka lub innych próbkach.

Funkcją podłoża Chocolate Agar jest wspomaganie diagnozy u pacjentów z objawami wskazującymi na potencjalne zakażenia wywołane przez *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* spp. lub inne bakterie wymagające.

Spośród około 20 gatunków rodzaju *Neisseria*, dwa są chorobotwórcze dla człowieka. Są to *Neisseria gonorrhoeae* oraz *Neisseria meningitidis*. *Neisseria gonorrhoeae* jest czynnikiem etiologicznym rzeżączki – choroby przenoszonej drogą płciową. Rzeżączka jest chorobą ostrą lub przewlekłą i najczęściej dotyczy cewki moczowej u mężczyzn, oraz cewki moczowej i kanału szyjki macicy u kobiet. Może także wywoływać zakażenia w obrębie odbytu i gardła, które zdarzają się coraz częściej i mają związek z różnymi praktykami seksualnymi. Głównym rezerwuarem *Neisseria gonorrhoeae* są bezobjawowi nosiciele.

Neisseria meningitidis, to ziarniak wywołujący inwazyjną chorobę meningokokową, w przebiegu której wstępuje sepsa, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i zapalenie płuc. *Neisseria meningitidis* jest wymagającą, tlenową Gram-ujemną dwoiwką. Obok *Haemophilus influenzae* oraz *Streptococcus pneumoniae* jest najczęstszym czynnikiem bakteryjnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Źródłem zakażenia są chorzy lub bezobjawowi nosiciele, ponieważ drobnoustroje te mogą kolonizować błony śluzowe górnych dróg oddechowych człowieka.

Pałeczki z gatunku *Haemophilus influenzae*, szczególnie wytwarzające otoczki odpowiedzialne są za ciężkie zakażenia inwazyjne (zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie nagleśni, ciężkie zapalenia płuc przebiegające z bakteriecią, zapalenie kości i stawów, zapalenie tkanki łącznej). Szczepy bezotoczkowe powodują infekcje nieinwazyjne takie jak: przewlekłe zapalenie oskrzeli, zapalenie płuc, ostre zapalenie ucha środkowego, zapalenie zatok i spojówek, a także zaostrzenia POChP. Paciorkowce w tym *Streptococcus pneumoniae* to najczęstsze czynniki zapalenia dróg oddechowych oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych oraz posocznicy.

Nr kat.:	Rodzaj podłoża:	Opakowanie:
1080PD90	podłoże stałe na płytce, gotowe do użycia	1x10 szt (90 mm)

2. Zasada działania

Enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych oraz hydrolizat kazeinowy dostarczają substancji odżywczych niezbędnych do wzrostu bakterii. Bufor fosforanowy zapobiega zmianom pH, które następują w procesie produkcji amin. Skrobia kukurydziana absorbuje kwasy tłuszczowe obecne w podłożu oraz substancje toksyczne powstające w procesach metabolicznych rosnących bakterii i jednocześnie stymuluje wzrost bakterii. Hemoglobina stanowi źródło heminy (czynnik X), która jest niezbędna do wzrostu *Haemophilus* spp. Dodatek wzrostowy w postaci Biovitex'u dostarcza czynnika V (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) potrzebnego do wzrostu *Haemophilus* spp., a także witamin, aminokwasów, koenzymów, glukozy, jonów żelaza i innych czynników niezbędnych do wzrostu patogennych gatunków *Neisseria* spp. oraz innych bakterii wymagających.

3. Skład podłoża

w g/l wody destylowanej:		Suplementy/ w g/l wody destylowanej:	
Enzymatyczny hydrolizat kazeinowy	7,5 g	Dodatek wzrostowy (Biovitex)	2,0 ml
Enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych	7,5 g	2% r-r hemoglobiny	100,0 ml
Skrobia kukurydziana	1,0 g		
Agar	10,0 g		
Chlorek sodu	5,0 g		
Wodorofosforan dipotasu	4,0 g		
Wodorofosforan potasu	1,0 g		

pH 7,2 ± 0,2 w temperaturze 25°C.

Wygląd podłoża - Podłoże jednorodne, brązowe

4. Przygotowanie pożywki

Pożywka jest gotowa do użycia. Bezpośrednio przed użyciem pożywkę należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

5. Wyposażenie wymagane, nie dostarczone

Sprzęt mikrobiologiczny ogólnolaboratoryjny niezbędny do wykonania badań, w tym cieplarka laboratoryjna lub cieplarka z możliwością kontroli atmosfery.

6. Środki ostrożności

- Produkt przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Produkt nieautomatyzowany.
- Podłoże zawiera składniki pochodzenia zwierzęcego, co może wiązać się z obecnością biologicznych czynników chorobotwórczych, dlatego z podłożem należy postępować zgodnie z zasadami pracy z materiałem biologicznym potencjalnie zakaźnym.
- Nie należy używać płytek, jeżeli na podłożu są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.
- Nie używać płytek uszkodzonych.
- Nie używać płytek po terminie ważności.
- Nie dopuszcza się ponownej inkubacji wcześniej posianych płytek.
- W celu zapewnienia poprawnych wyników badań, należy postępować zgodnie z niniejszą instrukcją.
- W przypadku, gdy postępowanie z pożywką podczas wykonywania badań będzie odbiegało od opisanego w niniejszej instrukcji, laboratorium jest zobowiązane do przeprowadzenia walidacji przyjętego postępowania.

7. Przechowywanie

Płytki z podłożem należy przechowywać w temperaturze 2–12°C do upływu terminu ważności. Podłoża przechowywać w oryginalnym opakowaniu w pozycji odwróconej, z dala od bezpośredniego źródła światła. Aby uniknąć zamrożenia agaru, nie należy przechowywać płytek blisko ścian lodówki. Aby uniknąć pojawienia się większej ilości wody na wieczku płytki nie należy otwierać zbyt często lodówki i nie przechowywać podłoży w przepelnionej lodówce.

8. Termin ważności

Podłoże przechowywane w temperaturze 2–12°C zachowuje swoje właściwości do 3 miesięcy od daty produkcji.

9. Materiał do badań

Próbki materiałów klinicznych pochodzące od człowieka lub inne próbki. Próbki do badań pobrać zgodnie z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi danego rodzaju materiału. Próbki pochodzące z zabiegów inwazyjnych (np. płyn mózgowo-rdzeniowy), należy pobierać zgodnie z procedurami obowiązującymi w danym szpitalu. Wymazy w kierunku *N. gonorrhoeae* należy pobierać na wymazówki dakronowe lub ze sztucznego jedwabiu, które mogą być przechowywane w temperaturze 2–6°C maksymalnie przez 3 godziny. Materiały pochodzące z dróg oddechowych, takie jak popłuczyny płuczkowo-oskrzelowe, płwocina, aspiraty powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej. Wymazy pobrane na podłoża transportowe należy przechowywać w temperaturze pokojowej lub zgodnie z zaleceniami producenta podłoża. Próbki płynu mózgowo-rdzeniowego lub krwi pobierane w kierunku meningokoków należy zabezpieczyć przed ochłodzeniem podczas transportu do laboratorium. Próbki do badań do czasu dostarczenia do laboratorium przechowywać zgodnie z zasadami przechowywania próbek określonymi przez laboratorium dla danego rodzaju materiału i sposobu pobrania. Materiały w kierunku izolacji gatunków *Neisseria* powinny być posiane niezwłocznie po pobraniu.

10. Sposób wykonania

1. Przed użyciem podłoże należy doprowadzić do temperatury pokojowej.
2. Posiać próbkę rozprowadzając ją na powierzchni agaru.
3. Jeżeli próbka została pobrana na wymazówkę - końcówkę wymazówki delikatnie obracać na niewielkim obszarze agaru tuż przy brzegach płytki, a następnie wykonać posiew redukcyjny przy użyciu jałowej czy.
4. Posianą płytkę jak najszybciej umieścić w cieplarni w atmosferze tlenowej wzbogaconej 5-10% CO₂ i inkubować w temperaturze 35 ± 2°C
5. Wynik wzrostu odczytać po 18-24 godzinach inkubacji. W przypadku braku wzrostu inkubację można przedłużyć do ok. 48 godzin.

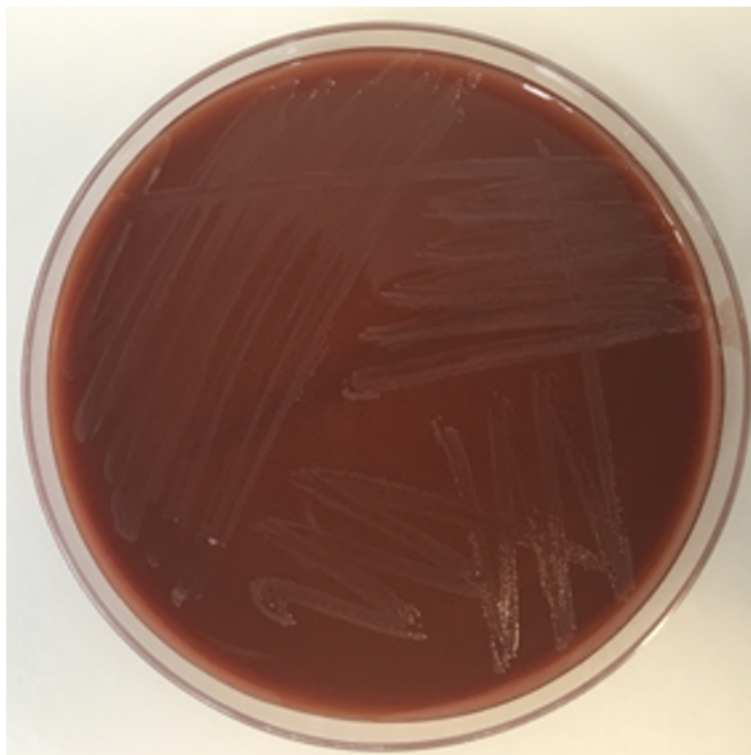
11. Odczyt i interpretacja wyników wzrostu

Po zakończeniu inkubacji obserwować:

- obecność wzrostu kolonii bakteryjnych,
- morfologię kolonii.

Typowa morfologia kolonii bakterii wyhodowanych na podłożu Chocolate Agar:

Mikroorganizm	Typowa morfologia kolonii
<i>Haemophilus influenzae</i>	Kolonie małe (1 mm), wilgotne, transparentne, perłowe, o charakterystycznym „mysim” zapachu
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Kolonie małe (0,5-2mm), lekko wypukłe, drobnoziarniste, szarawo-białe do bezbarwnych, błyszczące
<i>Neisseria meningitidis</i>	Kolonie średnie do dużych, niebiesko-szare, wypukłe, błyszczące, śluzowate
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Kolonie małe, płaskie, zielonkawe z żółto-zieloną strefą wokół kolonii



Morfologia kolonii i sposób wzrostu bakterii *Haemophilus influenzae* na podłożu Chocolate Agar

W celu ostatecznej identyfikacji wyhodowanych drobnoustrojów, należy przeprowadzić dodatkowe badania i / lub testy potwierdzające przy użyciu innych metod wykorzystywanych w laboratorium.

12. Kontrola jakości

Właściwości odżywcze podłoża należy kontrolować z użyciem szczepów odniesienia dających oczekiwane reakcje dodatnie. Badanie należy wykonywać używając czystych, świeżych hodowli szczepów odniesienia dających pożądaną reakcję. Do przeprowadzenia kontroli jakości podłoża, należy użyć następujących szczepów odniesienia:

Szczep odniesienia:	Intensywność wzrostu:	Morfologia kolonii:
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	dobry wzrost	małe (1 mm), wilgotne, transparentne, perłowe, o charakterystycznym „mysim” zapachu
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	dobry wzrost	małe, płaskie, zielonkawe z żółto-zieloną strefą wokół kolonii
<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	dobry wzrost	średnie do dużych, niebiesko-szare, śluzowate

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069	dobry wzrost	małe (0,5-2mm), lekko wypukłe, drobnoziarniste, szarawo-białe do bezbarwnych, błyszczące
---	--------------	--

Dopuszcza się stosowanie innych szczepów odniesienia zapewniających spójność pomiarową, zgodnie z procedurami i instrukcjami kontroli jakości obowiązującymi w laboratorium. Procedury kontroli jakości powinny spełniać wymagania obowiązujących przepisów oraz wytycznych/rekomendacji.

13. Ograniczenia metody

- Z powodu zmienności wymagań odżywczych, niektóre szczepy mogą rosnać słabo, albo nie rosnać wcale na podłożu Chocolate Agar.
- Nie wszystkie szczepy *Neisseria gonorrhoeae* wymagają do wzrostu atmosfery o zwiększonej zawartości CO₂, ale ich wzrost jest stymulowany przez CO₂
- Morfologia kolonii *Neisseria gonorrhoeae* wyhodowanych na pożywce Chocolate Agar może różnić się w zależności od fazy wzrostu
- Posiew próbki podejrzewanej o obecność *Neisseria gonorrhoeae* w miejscu opieki nad pacjentem natychmiast po pobraniu, zwiększa możliwość wykrycia *N. gonorrhoeae* w badanej próbce.
- W zależności od typu badanej próbki oraz poszukiwanego patogenu zaleca się posianie próbki na dodatkowe, podłoże selektywne przeznaczone do izolacji danego patogenu.
- W przypadku materiałów podejrzanych o obecność bakterii *Neisseria gonorrhoeae* nie należy pobierać próbek przy użyciu wymazówek bawełnianych, które zawierają kwasy tłuszczowe działające hamująco na *Neisseria gonorrhoeae*

14. Charakterystyka metody

Chocolate Agar jest jednym z podstawowych wzrostowych podłoży mikrobiologicznych wykorzystywanych do hodowli *Neisseria* i *Haemophilus* oraz innych bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych np., *Streptococcus*. Jest to podłoże składające się z pożywki GC Agar Base (Gonococcus Agar Base) z dodatkiem hemoglobiny i czynnika wzrostowego Biovitex. W porównaniu do innych pożywek, GC Agar Base zawiera mniejsze stężenie agaru, bowiem już w 1945 roku wykazano (Johnston), że sprzyja to wzrostowi *Neisseria gonorrhoeae* a także skraca czas inkubacji niezbędny dla stwierdzenia obecności kolonii gonokoków do 24 godzin. Carpenter i współpracownicy wykazali następnie, że dodanie do GC Agar hemoglobiny i ekstraktu drożdżowego dodatkowo wspiera wzrost gonokoków. W następnych latach (Thayer, Martin, 1967) ekstrakt drożdżowy został zastąpiony specjalnym dodatkiem będącym chemicznie zdefiniowaną mieszaniną składników odżywczych wspierających, nie tylko wzrost gonokoków, ale także innych bakterii wymagających, w tym z rodzaju *Haemophilus*.

Chocolate Agar jest podłożem, które może być modyfikowane poprzez dodatek środków przeciwdrobnoustrojowych, co zmienia tę pożywkę w podłoże selektywne służące do hodowli np. *Haemophilus* (Chocolate Agar z bacytracyną) lub umożliwia wybiórczą hodowlę bakterii w próbkach zawierających mieszaną florę bakteryjną (np. dodatek kolistyny, wankomycyny). Dodatek pirydoksalu wspomaga wzrost streptokoków.

Pożywka GC Agar Base jest pożywką wyjściową dla innych podłoży takich jak np. Thayer-Martin (TM), Thayer-Martin Modified (MTM), Transgrow i innych.

Chocolate Agar ma często zastosowanie przy izolacji *Neisseria gonorrhoeae*, ale w takich przypadkach najlepiej jest stosować je z innymi podłożami w celu zwiększenia czułości badania. Bonin P. i wsp. porównali trzy podłoża do izolacji *Neisseria gonorrhoeae*: Chocolate Agar (CA), zmodyfikowane podłoże Thayer-Martin z dodatkiem nystatyny, wankomycyny, kolistyny i trimetoprimu (MTM-NVCT) oraz podłoże MTM bez dodatku wankomycyny (MTM-VFSM). Spośród 326 zakażeń gonokokowych kanału szyjki macicy, 92% zostało wykrytych przy użyciu podłoża CA w porównaniu z 98,2% przy użyciu podłoża MTM. Podobnie z 306 zakażeń gonokokowych kanału szyjki macicy, 95,8% zakażeń wykryto przy wykorzystaniu podłoża MTM-VFSM w porównaniu do 98,4% przy użyciu podłoża MTM-NVCT. W przypadku 1632 przypadków zakażeń cewki moczowej u mężczyzn wszystkie trzy podłoża były równorzędne i wykrywały powyżej 98% przypadków infekcji.

15. Postępowanie ze zużytymi podłożami

Podłoża po badaniach oraz nieużyte podłoża należy utylizować zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami dotyczącymi postępowania z odpadami medycznymi oraz procedurami laboratorium odnośnie utylizacji materiałów zakaźnych i potencjalnie zakaźnych.

16. Zgłaszanie zdarzeń niepożądanych





Zgodnie z obowiązującymi przepisami, zdarzenia niepożądane i incydenty, które można bezpośrednio powiązać z opisywanym podłożem, należy zgłaszać producentowi oraz Prezesowi Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych na adres:

Historia zmian dokumentu

Data zmiany	Sekcja	Opis zmiany
2022/11/04	Cały dokument	Dostosowanie do wymagań Rozporządzenia UE 2017/746
2024/02/29	Pkt. 1,2,3,9,10,11,13,14	Uzupełnienie treści

UWAGA

Historia zmian dokumentu nie uwzględnia zmian redakcyjnych.

SYMBOL	NAZWA SYMBOLU	OPIS	NR REF.
	Wytwórca	Oznacza wytwórcę wyrobu medycznego zgodnie z definicją zawartą w dyrektywach unijnych 90/385/EWG, 93/42/EWG oraz 98/79/WE.	5.1.1
	Data produkcji	Oznacza datę produkcji wyrobu medycznego.	5.1.3
	Numer katalogowy	Oznacza numer produktu w katalogu producenta pozwalający zidentyfikować wyrób medyczny.	5.1.6
	Numer serii / kod partii	Oznacza nadany przez producenta numer partii pozwalający zidentyfikować partię produktów, do której należy wyrób medyczny.	5.1.5

	Wyrób do diagnostyki in vitro	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro	5.5.1
	Nie używać powtórnie	Oznacza wyrób medyczny przeznaczony do jednokrotnego użytku lub do użytku podczas leczenia jednego pacjenta w ramach jednej procedury medycznej.	5.4.2
	Wystarczy na wykonanie <n> testów	Oznacza nadaną przez producenta wartość na ile testów wystarczy wyrób.	5.5.5
	Data przydatności do użycia	Oznacza datę, po której wyrób medyczny nie powinien być używany.	5.1.4
	Przestrzegać zakresu temperatury	Wskazuje maksymalną i minimalną wartość temperatury, w której należy przechowywać, transportować lub użytkować przedmiot.	5.3.7
	Symbol bezpieczeństwa (Zgodność z wymogami UE)	Oznaczenie CE na produkcie stanowi deklarację producenta potwierdzającą zgodność produktu z zasadniczymi wymogami odpowiednich przepisów Unii Europejskiej dotyczących zdrowia, bezpieczeństwa i ochrony środowiska.	nd.
	Sprawdź w instrukcji użycia	Oznacza konieczność zapoznania się z instrukcją użytkowania	5.4.3
	Sterylizowany aseptycznymi technikami przetwarzania	Wskazuje wyrób medyczny, który został wytworzony za pomocą zaakceptowanych technik aseptycznych.	5.2.2
	Nie używać w przypadku uszkodzonego opakowania	Oznacza wyrób medyczny, który nie powinien być używany, jeśli opakowanie zostało uszkodzone lub otwarte.	5.2.8
	Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego	Oznacza wyrób medyczny zawierający materiał biologiczny tj. tkanki, komórki lub ich pochodne pochodzenia zwierzęcego.	5.4.8