

## 1. Przeznaczenie

Thayer Martin Agar Modified (MTM Agar) jest selektywnym podłożem do jakościowego wykrywania i izolacji *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis* w próbkach materiałów klinicznych pochodzących od człowieka zawierających mieszaną florę bakteryjną i grzybiczą.

Funkcją podłoża Thayer Martin Agar Modified (MTM Agar) jest wspomaganie diagnozy u pacjentów z objawami wskazującymi na potencjalne zakażenia układu moczowo-płciowego wywołanego przez *Neisseria gonorrhoeae* lub nosicielstwa/zakażenia *Neisseria meningitidis*.

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 zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. *Neisseria meningitidis* jest wymagającą, tlenową Gram-ujemną dwóinką. Obok *Haemophilus influenzae* oraz *Streptococcus pneumoniae* jest najczęstszym czynnikiem bakteryjnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, które może przebiegać bardzo ciężko, z posocznicą i prowadzić do powikłań w postaci np. ropni mózgu. Źródłem zakażenia są bezobjawowi nosiciele, ponieważ drobnoustroje te mogą kolonizować błony śluzowe górnych dróg oddechowych człowieka.

| Nr kat.: | Rodzaj podłoża:                           | Opakowanie:      |
|----------|---|------------------|
| 1083PD90 | podłoże stałe na płytce, gotowe do użycia | 1x10 szt (90 mm) |

## 2. Zasada działania

Thayer Martin Agar Modified (MTM Agar) to wzbogacone podłoże zawierające enzymatyczny hydrolyzат tkanek kazeinowy oraz wyciąg mięsny, które dostarczają substancji odżywczych niezbędnych do wzrostu bakterii wymagających. Diwodorofosforan potasu oraz wodorofosforan dipotasu zapobiegają zmianom pH, które następują w procesie produkcji amin. Skrobia kukurydziana neutralizuje kwasy tłuszczowe i absorbuje substancje toksyczne znajdujące się w badanej próbce i jednocześnie stymuluje wzrost bakterii. Hemoglobina stanowi źródło heminy (czynnika X), która wzmacnia wzrost gonokoków. Dodatek wzrostowy dostarcza czynnika V (NAD) potrzebnego do wzrostu mikroorganizmów o wysokich wymaganiach odżywczych, a także witamin, aminokwasów, koenzymów, glukozy, jonów żelaza. Wankomycyna i kolistyna są czynnikami selektywnymi, które hamują odpowiednio wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w tym niemal wszystkich saprofitycznych *Neisseria* spp. Nystatyna hamuje wzrost drożdżaków, w tym *Candida albicans* i innych grzybów, zaś trimetoprim działa hamująco na pelzakowaty wzrost *Protens*.

## 3. Skład podłoża

| w g/l wody destylowanej:          |        | Suplementy/ litr pożywki: |           |
|-----------------------------------|--------|---------------------------|-----------|
| Enzymatyczny hydrolyzат kazeinowy | 7,5 g  | 2% roztwór hemoglobiny    | 100 ml    |
| Wyciąg mięsny                     | 7,5 g  | Dodatek wzrostowy         | 10 ml     |
| Diwodorofosforan potasu           | 1,0 g  | Trimetoprim               | 0,005 g   |
| Agar                              | 10,0 g | Kolistyna                 | 0,0075 g  |
| Chlorek sodu                      | 5,0 g  | Nystatyna                 | 0,00027 g |
| Wodorofosforan dipotasu           | 4,0 g  | Wankomycyna               | 0,003 g   |
| Skrobia kukurydziana              | 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, cieplarka z możliwością regulacji zawartości CO<sub>2</sub>, lub system do wzbogacania atmosfery w CO<sub>2</sub>.

#### 6. Środki ostrożności

- Produkt przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Produkt niezautomatyzowany.
- 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 badania 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 ciemności w oryginalnym opakowaniu w pozycji odwróconej. 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 takie jak wydzielina lub wymaz z cewki moczowej (mężczyźni), wymaz z pochwy, a także wymaz z odbytu i wymaz z gardła.

Wymazy pobierać na plastikowe wymazówki dakronowe lub ze sztucznego jedwabiu i zabezpieczyć przed wyschnięciem i utlenieniem poprzez umieszczenie w podłożu transportowym np. Amies lub innym podłożu transportowo-wzrostowym. Pobrane próbki dostarczyć do laboratorium w możliwie jak najkrótszym czasie, najlepiej nie później niż w ciągu 1-2 godzin po pobraniu. Jeśli nie jest to możliwe, próbki pobrane do podłoża transportowego można przechowywać w temperaturze pokojowej i dostarczyć do laboratorium w ciągu 24 godzin od pobrania. Próbki należy pobierać przed rozpoczęciem antybiotykoterapii. Próbki do badań pobrać zgodnie z aktualnymi wytycznymi podanymi przez laboratorium. Próbki do badań do czasu dostarczenia do laboratorium przechowywać zgodnie z zasadami przechowywania próbek obowiązującymi w laboratorium.

#### 10. Sposób wykonania

Uwaga

Próbki powinny być posiane natychmiast po dostarczeniu do laboratorium.

1. Przed użyciem podłoże należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Powierzchnia agaru nie powinna być przesuszona.
2. Posiać próbkę rozprowadzając ją na powierzchni agaru.
3. Jeżeli próbka została pobrana na wymazówkę - końcówkę wymazówki delikatnie obracać dociskając do powierzchni agaru, w celu przeniesienia na podłoże jak największej ilości drobnoustrojów, a następnie wykonać posiew redukcyjny przy użyciu jałowej ezy.
4. Posianą płytkę natychmiast umieścić w cieplarni i inkubować wieczkiem do dołu w warunkach tlenowych w atmosferze wzbogaconej CO<sub>2</sub>, w temperaturze 35 ± 1°C. Temperatura inkubacji nie powinna przekraczać 37°C, zaś stężenie CO<sub>2</sub> nie powinno przekroczyć 5-10%.
5. Wynik wzrostu odczytać po 18-24 godzinach inkubacji. Jeśli w tym czasie nie zaobserwowano wzrostu, inkubację przedłużyć o kolejne 24 godziny.

6. Identyfikacja *N. gonorrhoeae* powinna być wykonywana w młodych 18-24 godzinnych hodowlach.

## 11. Odczyt i interpretacja wyników wzrostu

Po zakończeniu inkubacji obserwować:

- obecność wzrostu kolonii bakteryjnych,
- morfologię kolonii.

Typowa morfologia kolonii bakterii wyhodowanych na podłożu Thayer Martin Agar Modified:

| Mikroorganizm                 | Typowa morfologia kolonii  |
|-------------------------------|--|
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i>  | Kolonie małe, okrągłe, wypukłe, szaro-białe do bezbarwnych, lśniące, śluzowate o gładkiej konsystencji |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Kolonie średnie do dużych, okrągłe, wypukłe, niebiesko-szare, lśniące, śluzowate                       |

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



Morfologia kolonii i sposób wzrostu bakterii *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis* na podłożu Thayer Martin Agar Modified

## 12. Kontrola jakości

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

| Szczep odniesienia:                          | Intensywność wzrostu: | Morfologia kolonii:  |
|--|-----------------------|--|
| <i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090     | dobry wzrost          | małe, okrągłe, wypukłe, szaro-białe, lśniące, gładkie, śluzowate o gładkiej konsystencji |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 43069      | dobry wzrost          | średnie do dużych, okrągłe, wypukłe, niebiesko-szara, lśniące, śluzowate                 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | brak wzrostu          | —  |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922           | brak wzrostu          | —  |

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 patogennych *Neisseria* mogą rosnać słabo, albo nie rosnać wcale na podłożu Thayer Martin Agar Modified.
- W przypadku podejrzenia zakażenia wywołanego przez *Neisseria gonorrhoeae*, wymazów nie należy pobierać przy użyciu bawełnianych wymazówek, które mogą zawierać kwasy tłuszczowe działające hamująco na *Neisseria gonorrhoeae*
- Inkubacja patogennych *Neisseria* w atmosferze o stężeniu CO<sub>2</sub> powyżej 10% może hamować wzrost niektórych szczepów.
- Thayer Martin Agar Modified może hamować inne bakterie chorobotwórcze obecne w próbce, np. *Haemophilus*.
- Mimo, iż zastosowane antybiotyki hamują wzrost saprofitycznych *Neisseria* na pożywce Thayer Martin Agar Modified, to jednak w sporadycznych przypadkach można uzyskać wzrost *Neisseria lactamica*
- Zastosowanie podłoża transportowo-wzrostowego Transgrow do pobrania i transportowania próbek, zwiększa możliwość wykrycia *Neisseria* w pobranej próbce
- W próbkach pochodzących z jamy ustnej i gardła mogą wyrosnąć niektóre szczepy gatunków *Campylobacter*
- Na podłożu Thayer Martin Agar Modified zawierającym antybiotyki (VCNT) mogą nie urosnąć wrażliwe szczepy patogennych *Neisseria*
- Posiew próbki podejrzonej o obecność *Neisseria gonorrhoeae* w miejscu opieki nad pacjentem natychmiast po pobraniu, zwiększa możliwość wykrycia *N. gonorrhoeae* w badanej próbce
- *Neisseria meningitidis* ma tendencję do autolizy podczas przedłużonej inkubacji.
- W każdym przypadku podejrzenia zakażenia wywołanego przez *Neisseria* spp., obok oceny morfologii kolonii należy wykonać preparat barwiony metodą Gram i ocenić morfologię bakterii.
- Wiele szczepów *Neisseria gonorrhoeae* wykazuje wrażliwość na temperaturę inkubacji, i szczepy te nie będą dobrze rosły w temperaturze powyżej 37°C.

### 14. Charakterystyka metody

Spośród wszystkich gatunków *Neisseria*, tylko dwa są chorobotwórcze dla człowieka i tylko dla człowieka. Są to *Neisseria gonorrhoeae* oraz *Neisseria meningitidis*. *Neisseria gonorrhoeae* jest czynnikiem etiologicznym rzeżączki, choroby przenoszonej drogą płciową, natomiast *Neisseria meningitidis* wywołuje zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. *Neisseria* są drobnoustrojami o wysokich wymaganiach odżywczych i dlatego ich hodowla jest możliwa tylko na wyselekcjonowanych podłożach. Wszystkie szczepy wymagają do wzrostu cysteiny, a wiele z nich także innych aminokwasów, puryn, pirymidyn i witamin. Istotnym elementem podłoża jest dodatek antybiotyków, hamujących wzrost innych drobnoustrojów, należy jednak pamiętać, że dodawana do podłoża wankomycyna, może również hamować wzrost niektórych, wrażliwych szczepów.

Do izolacji *Neisseria* stosuje się różne podłoża. Jednym z nich jest modyfikowane podłoże Thayer Martina.

Bonin P. i wsp. na łamach J. Clin. Microbiol. przedstawili wyniki badań porównawczych trzech różnych podłoży do izolacji *Neisseria gonorrhoeae* z próbek klinicznych. Do badań wykorzystano Agar czekoladowy (CA), modyfikowane podłoże Thayer Martina (MTM) oraz pozbawione wankomycyny selektywne podłoże (VFSM). Spośród 326 przypadków zakażeń, z próbek z szyjki macicy na podłożu CA wykryto 92%, a na podłożu MTM 98,2% infekcji. Spośród 306 zakażeń szyjki macicy inokulowanych na podłożu MTM oraz VFSM, 95,8% wykryto 98,4% na podłożu MTM, zaś na podłożu VFSM. W badaniach 1632 materiałów klinicznych pochodzących od mężczyzn z zakażeniem cewki moczowej, wszystkie trzy podłoża były równoważne, przy czym każde z nich wykrywało nie mniej niż 98% przypadków zakażeń. Wykonano również badania porównawcze pojedynczej i podwójnej inokulacji. Stwierdzono, że podwójna inokulacja podłoża MTM zwiększa częstość izolacji o 1,5% dla zakażeń cewki moczowej (206 przebadanych próbek) oraz 2,4% dla zakażeń szyjki macicy (83 próbki).

Wyniki podobnych badań opublikował zespół Chapel T.A. na łamach Health Lab. Sci. W badaniach tych nie stwierdzono jednak różnicy między stosowaniem pojedynczych i podwójnych inokulacji, co wpływa na koszty diagnostyki chorób przenoszonych drogą płciową.

W 2000 roku, na łamach J. Clin. Microbiol. Beverly A i wsp. opublikowali wyniki badań porównawczych nowego podłoża

wybiórczego do izolacji *Neisseria* z modyfikowanym podłożem Thayer Martina (MTM) i nie stwierdzono różnic w wynikach uzyskiwanych dla obu zastosowanych podłoży.




#### 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:

Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych  
Al. Jerozolimskie 181C, 02-222 Warszawa;  
Telefon: 48 22 492-11-00  
Fax: 48 22 492-11-09

| 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 |