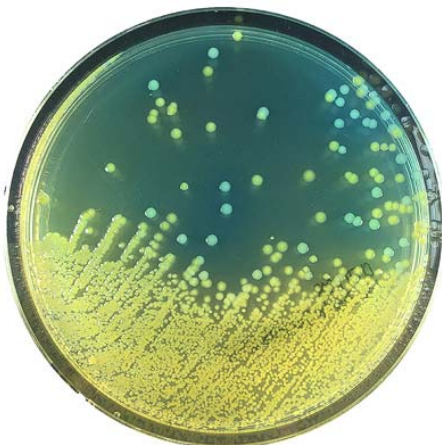


**INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING**

CLED MEDIUM

Dehydratiserat odlingsmedium



CLED MEDIUM:
Laktosfermenterande *E.coli* (gula kolonier) och
laktosfermenterande *Salmonella* (blå kolonier)

1 - AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. Differentiellt odlingsmedium för isolering, räkning och presumtiv identifiering av mikroorganismer från urin.

2 - SAMMANSÄTTNING - TYPISK FORMEL *
(EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN)

Tryptone	4.000 g
Pancreatic digest of gelatin	4.000 g
Peptone	3.000 g
Lactose	10.000 g
L-cystine	0.128 g
Bromothymol blue	0.020 g
Agar	15.000 g

*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de prestandakriterier som krävs.

3 - PRINCIP FÖR METODEN OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

CLED Medium baseras på det "elektrolytbristmedium" som först beskrevs av Sandys¹ för urinbakteriologi för att förhindra svärmning av *Proteus* spp och senare modifierades av Mackey och Sandys² genom att mannitol ersattes med 1% laktos och 0.2% sackaros och pH-indikatorn och agarkoncentrationerna ökades. Mackey och Sandys³ modifierade mediet ytterligare genom att tillsätta L-cystin för att öka tillväxten av cystinberoende "dvärgkoloni"-koliformer och genom att ta bort sackaros. Detta slutliga Cystine - Lactose - Electrolyte - Deficient (C.L.E.D.) medium har visat sig vara idealiskt för inokulering med dip-slide och för urinbakteriologi i allmänhet, med god differentiering av kolonierna och lätt igenkänning som särskilda kännetecken.³ Det stöder tillväxt av alla potentiella patogener i urinvägarna. Det stöder också tillväxten av ett antal viktiga föroreningar såsom difteroider, laktobaciller och mikrokokker, vilket ger en indikation på föroreningens omfattning, och samtidigt som det är icke-hämmande förhindrar det svärmning av *Proteus* sp.³ Animaliska peptoner ger kol, kväve, vitaminer och spårämnen för mikrobiell tillväxt. Cystin ökar tillväxten av "dvärgkoloni"-koliformer³; laktos finns i mediet som en fermenterbar kolhydrat: laktosfermenterande bakterier gör mediet surt med en färgförändring av bromothymolblått från blågrönt till gult.

4 - ANVISNINGAR FÖR MEDIUMBEREDNING

Suspendera 36.2 g i 1000 mL kallt renat vatten. Värm till kokning under kraftig omrörning och sterilisera genom autoklavering vid 121°C i 15 minuter. Kyl till 47-50°C, blanda väl och häll upp i sterila petriskålar.

5 - FYSISKA EGENSKAPER

Dehydrerat medium utseende	gröngrått, fint, homogent, fritt flytande pulver
Medium utseende på lösning och plattor	blågrön, klar
Slutligt pH vid 20-25 °C	7.3 ± 0.2

5 - TILLHANDAHÅLLET MATERIAL - FÖRPACKNINGAR

Produkt	Typ	REF	Förpackning
CLED MEDIUM	Dehydratiserat medium	40129012	500 g (13.8 liter)
		40129014	5 kg (138L)

7 - MATERIAL KRÄVS MEN TILLHANDAHÅLLS INTE

Autoklav, vattenbad, sterila slingor och pinnar, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, petriskålar, Erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 - PROVEXEMPLAR

CLED Medium är avsedd för mikrobiologisk bearbetning av kliniska prover, t.ex. urin. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. God laboratoriepraxis för insamling, transport och förvaring av kliniska prover ska tillämpas.^{4,5}

9 - PROVNINGSFÖRFARANDE

Låt plattorna anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka.

Blanda urinen försiktigt för att undvika skumbildning. Doppa änden av en steril kalibrerad slinga (t.ex. 1 µL eller 10 µL) i urinen till strax under ytan och ta bort den vertikalt, se till att inte föra över något på skaftet. Använd detta för att ympa CLED Medium-plattan från topp till botten i en vertikal linje och igen från topp till botten vinkelrätt mot denna linje på ett fram-och-tillbaka sätt. Inokulumet av urin sprids över hela agarytan för att förenkla räkningen av kolonier efter tillväxt.

Inkubera vid 35-37°C i luft i 24-48 timmar.

Även om de flesta urinvägs patogener växer lätt, kan det hända att långsamt växande patogener och sådana som hämmas av antimikrobiella medel i patientprovet inte syns efter inkubation över natten (16 h). Utför leukocytesteras- och nitrittester för att avgöra vilka kulturer som ska





inkuberas i hela 48 timmar. Urinkulturer som är negativa efter inkubation över natten men som hade ett eller båda positiva enzymtester ska inkuberas i ytterligare en dag eller ympas på nytt på en blodagarplatta.⁴

10 - LÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubationen observeras bakterietillväxten, antalet kolonier (CFU) på plattan räknas och koloniernas specifika morfologiska, kromatiska egenskaper registreras.

Om en 1 µL-slinga används motsvarar en koloni 1000 CFU/mL, om en 10 µL-slinga används motsvarar en koloni 100 CFU/mL.

Studier som genomfördes på 1950-talet ligger fortfarande till grund för tolkningen av urinodlingsresultat och visar att bakterietal på $\geq 10^5$ CFU/mL tyder på en infektion och att tal under detta vanligtvis tyder på kontaminering.⁵

I vissa patientgrupper kan värden mellan 10^5 CFU/mL och 10^2 CFU/mL vara signifikanta; ett rent isolat med värden mellan 10^4 och 10^5 CFU/mL bör utvärderas baserat på klinisk information eller bekräftas genom upprepade odling.⁵ För urin som samlats in genom suprapubisk punktering av urinblåsan indikerar alla CFU som detekteras en infektion.⁵

Se lämpliga referenser för fullständiga tolkningskriterier för det mikrobiella antalet.^{4,5}

Typisk kolonimorfologi på CLED Medium är följande⁶:

<i>Escherichia coli</i>	Gula, ogenomskinliga kolonier, centrum något djupare gult
<i>Klebsiella/Enterobacter</i>	Gula till vitblå kolonier, slemmiga
<i>Salmonella</i>	Blå, platta kolonier
<i>Proteus</i>	Blå, genomskinliga kolonier
<i>Pseudomonas</i>	Gröna kolonier, med typiskt grov (matt) yta och periferi
EnterokockerSmå	gula kolonier
<i>Staphylococcus aureus</i>	Djupgula kolonier, enhetlig färg
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Blekgula kolonier, mer genomskinliga än <i>S.aureus</i>

11 - KVALITETSKONTROLL FÖR ANVÄNDARE

Alla tillverkade partier av produkten släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera överensstämmelsen med specifikationerna. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Här nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontrollen.⁷

KONTROLLSTAMMAR		INKUBATION T° / T / ATME	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>S.aureus</i>	ATCC25923	35-37°C / 18-24H / A	god tillväxt, gula kolonier
<i>E.coli</i>	ATCC25922	35-37°C / 18-24H / A	god tillväxt, gula kolonier med gul halo
<i>P.vulgaris</i>	ATCC 8427	35-37°C / 18-24H / A	god tillväxt, blåaktiga kolonier som inte svärmar

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke som står för American Type Culture Collection

12- PRESTATIONER EGENSKAPER

Innan CLED Medium släpps ut för försäljning skall ett representativt urval av alla partier av dehydrerad CLED Medium testas för produktivitet genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti och med Tryptic Soy Agar.

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med målstammen *E.faecalis* ATCC 19433. CLED-agarplattor inokuleras med decimalspädningar i saltlösning av en kolonisuspension och inkuberas vid 35-37 °C i 18-24 timmar. Kolonierna räknas på CLED- och TSA-plattor och produktivetsförhållandet beräknas ($Pr=CFU_{CLED}/CFU_{TSA}$). Om Pr är ≥ 0.5 och om koloniernas morfologi och färg är typiska (gula kolonier) anses resultaten vara acceptabla och överensstämma med specifikationerna. Dessutom testas produktivitetsegenskaperna med semikvantitativ ekometrisk teknik med följande stammar: *E.coli* ATCC 25922, *P.vulgaris* ATCC 9484, *P.mirabilis* ATCC 10005, *E.aerogenes* ATCC 13048, *K.pneumoniae* ATCC 27736, *S.aureus* ATCC 25923, *C.albicans* ATCC 18804. Efter inkubation utvärderas och registreras kolonierna, mediumfärgen och mängden tillväxt. Alla stammar visar en god tillväxt med typiska färger.

13 - METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Mediet är i princip icke-selektivt, men på grund av elektrolytexkludering växer *Shigella* spp. vanligtvis inte på mediet.⁶
- Om man i provet misstänker förekomst av genitourinära patogener som *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma*, måste specifika odlingsmedier inokuleras.
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska och kromatiska egenskaper, rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från renkultur för fullständig identifiering. Om så krävs och är relevant skall antimikrobiell känslighetstestning utföras.
- Detta odlingsmedium är avsett som hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

14 - FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Denna produkt är en kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast för professionellt bruk; den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal, med iakttagande av godkända försiktighetsåtgärder mot biologisk fara och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Läs säkerhetsdatabladet före användning.
- Tillämpa god tillverkningssed i produktionsprocessen för beredda medier.
- Detta odlingsmedium innehåller råvaror av animaliskt ursprung. *Ante*- och *post mortem*-kontrollerna av djuren och kontrollerna under råvarornas produktions- och distributionscykel kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller någon överförbar patogen. Därför rekommenderas att odlingsmediet behandlas som potentiellt infektiöst och hanteras med iakttagande av sedvanliga särskilda försiktighetsåtgärder: får inte intas, andas in eller komma i kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Alla laboratorieprover bör betraktas som infektiösa.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera det oanvända mediet och de steriliserade plattorna som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet som aktiv ingrediens i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur





- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkten finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- Meddela Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och de relevanta myndigheterna om alla allvarliga incidenter som inträffar i samband med användningen av *in vitro*-diagnostiken.
- Informationen i detta dokument har definierats efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten men utan förpliktelse eller ansvar. I samtliga fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardprocedurer följas för undersökning av prover som samlats in från organiska områden från människor och djur, för miljöprover och för produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att vår produkt är lämplig för det avsedda ändamålet.

15 - LAGRINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHETSTID

Förvaras vid +10°C /+30°C på en torr plats, skyddad från direkt ljus. Vid korrekt förvaring kan produkten användas fram till utgångsdatum. Använd inte efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren förslutas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdnande, stora klumpar).

Användaren ansvarar för tillverkning och kvalitetskontroll av beredda medier och för validering av hållbarhetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (plattor/tuber/flaskor) och lagringsmetod (temperatur och förpackning).

15 - REFERENSER

- Sandys GH. En ny metod för att förhindra svärmning av *Proteus* sp med en beskrivning av ett nytt medium som är lämpligt för användning i rutinmässig laboratoriepraxis. J Med Lab Technol 1960;17:224-233
- Mackey JP, Sandys GH. Laboratoriediagnos av urinvägsinfektion i allmänpraktik med hjälp av ett transportmedium för dip-inokulum Br Med J 1965; 2:1286-1288
- Mackey JP, Sandys GH. Korrespondens. Diagnos av urinvägsinfektioner. Br Med J 1966; 1:1173
- Baron EJ, Provtagnings, transport och bearbetning: Bakteriologi. I Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. redaktörer. Manual för klinisk mikrobiologi, 11:e upplagan. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. s.270.
- Public Health England UK-standarder för mikrobiologiska undersökningar. Undersökning av urin. Bakteriologi, B 41, 2019
- MacFaddin JF. Media för isolering-kultivering-identifiering-underhåll av medicinska bakterier. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- CLSI (tidigare NCCLS) Kvalitetskontroll av kommersiellt framställda odlingsmedier. Godkänd standard, 3:e utgåvan. M22 A3 vol. 24 nr 19, 2004

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller REF Katalognummer	LOT Sats kod	IVD <i>In vitro</i> - diagnostik Medicinteknik a produkter	Tillverkare	Använd av
Temperaturbegränsning	Innehåll tillräckligt för <n> tester	Konsultera bruksanvisningen	Förvaras åtskilt från direkt ljus	Förvaras på en torr plats

REVISIONSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringar	Datum
Revision 2	Uppdaterad layout och innehåll	2020/05
Revision 3	Uppdatering av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "lagringsförhållanden och hållbarhetstid"	2022/02
Revision 4	Avlägsnande av föråldrad klassificering	2023/04

Obs: mindre typografiska, grammatiska och formateringsmässiga ändringar ingår inte i revisionshistoriken.

