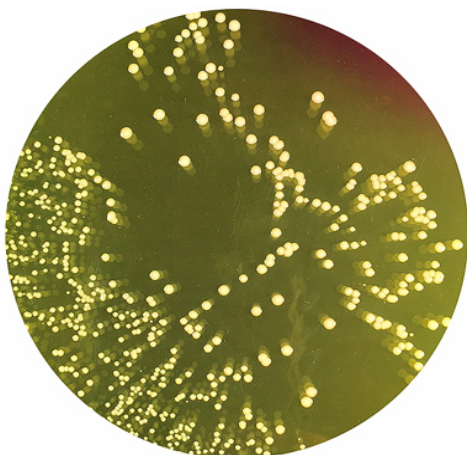




ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

MANNITOL SALT AGAR

Dehydrerat odlingsmedium

*S.aureus* på Mannitol Salt Agar**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Selektivt medium för isolering och differentiering av stafylokocker från kliniska prover. För detektion av *Staphylococcus aureus* i icke-sterila farmaceutiska produkter enligt den harmoniserade metoden EP, USP, JP och i kosmetika.

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

Pankreatisk nedbrytning av kasein	5,000 g
Pankreasdigerering av djurvävnad	5,000 g
Nötköttextrakt	1,000 g
Natriumklorid	75,000 g
Mannitol	10,000 g
Fenolrött	0,025 g
Agar	15,000 g

*Formeln kan justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de erforderliga prestandakriterierna.

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Staphylococcus-arter är grampositiva, icke-rörliga, icke-sporframkallande kocker av varierande storlek som förekommer enskilt, i par och i oregelbundna kluster. Den optimala tillväxttemperaturen är 30–37 °C. De är fakultativa anaerobes och har en fermentativ metabolism. *S.aureus* är en allmänt förekommande kommensal bakterie på människors hud och i näsans främre del, men orsakar ofta allvarliga infektioner hos människor.

Mannitol Salt Agar baseras på tidiga arbeten av Gordon¹ som visade att fermenteringen av mannitol kunde användas som ett sätt att skilja patogena från icke-patogena stafylokocker, och på Kochs² upptäckt att närvaron av 7,5 % natriumklorid i odlingsmediet hämmade tillväxten av de flesta organismer utom stafylokocker. Chapman³ använde denna information för att formulera fenolröd mannitolagar med 7,5 % natriumklorid.

Mannitol Salt Agar är ett selektivt och differentiellt medium avsett för isolering av stafylokocker från kliniska prover^{4,5} och för differentiering av mannitolfermenterande från icke-fermenterande stafylokocker. I kliniska prover tyder mannitolpositiva isolat på *S.aureus* och bör testas vidare.⁶

Mannitol Salt Agar uppfyller harmoniserade EP-, USP- och JP-krav⁷ för detektion av *S.aureus* i icke-sterila läkemedel och rekommenderas för detektion av *S.aureus* i kosmetika^{8,9}.

Peptoner tillhandahåller kol, kväve och spårämnen för bakterietillväxt, natriumklorid i en koncentration på 75 g/l skapar ett högt osmotiskt tryck: stafylokocker tål trycket, medan denna koncentration hämmar tillväxten av de flesta andra grampositiva och gramnegativa bakterier². Dessutom innehåller mediet mannitol som fermenterbart kolhydrat och fenolrött som pH-indikator. När mannitol fermenteras bildas syra, vilket sänker pH-värdet och resulterar i att ett gult område bildas runt en isolerad koloni. Mannitol-icke-fermenterare som tål den höga saltkoncentrationen visar ett rött till rosa område på grund av peptonnedbrytning⁶.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 111 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm till kokpunkt under omrörning och sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl till 47–50 °C, blanda väl och häll i sterila petriskålar.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på dehydratiserat medium	rosa, fint, homogent, fritt flytande pulver
Utseende på lösning och preparerade plattor	rödviolett, klar
Slutligt pH vid 20–25 °C	7,4 ± 0,2

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Mannitol Salt Agar	Dehydrerat medium	4016652	500 g (4,5 L)
		4016654	5 kg (45 L)

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

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

8 – PROVER

Mannitol Salt Agar är avsett för bakteriologisk undersökning av humana kliniska prover från kontaminerade källor, såsom avföring, material från luftvägarna, purulenta exsudat, sår och abscesser^{4,5,10} och icke-kliniska prover, såsom icke-sterila läkemedel och kosmetika^{8,9}. Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. zGod labororiesed för insamling, transport och förvaring av kliniska prover bör tillämpas.¹¹ Se lämpliga standardmetoder för detaljer om provtagning och beredning av icke-sterila läkemedel och kosmetika^{7,8,9}.





9 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka.

Inokulera och stryk ut provet med en ögla över de fyra kvadranterna på plattan för att få väl isolerade kolonier, och se till att sektionerna 1 och 4 inte överlappar varandra. Alternativt, om materialet odlas direkt från en bomullspinne, rulla bomullsspinnen över ett litet område på ytan vid kanten; stryk sedan från detta inokulerade område.

Inkubera under aeroba förhållanden vid 35–37 °C och notera resultaten efter 24 och 48 timmar.

För detektion av *S.aureus* i icke-sterila läkemedel, följ den testmetod som beskrivs av EP och sammanfattas nedan.

Använd 10 ml eller den mängd som motsvarar 1 g eller 1 ml prov för att inokulera en lämplig mängd Tryptone Soy Broth. Blanda och inkubera vid 30–35 °C i 18–24 timmar. Subkultivera genom att stryka på en platta med mannitolsaltagar och inkubera vid 30–35 °C i 18–72 timmar.

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observerar du bakterietillväxten och noterar koloniernas specifika morfologiska och kromatiska egenskaper.

Kolonier som misstänks vara *S.aureus* är gula/vita och omgivna av en gul zon.

Mannitol-icke-fermenterande stafylokocker bildar små kolonier utan färgförändring i mediet eller med en röd eller lila zon.

Det är obligatoriskt att bekräfta misstänkta *S.aureus*-isolat som återfinns på Mannitol Salt Agar.¹⁰

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkten släpps ut för försäljning efter att kvalitetskontroll har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Slut användaren kan dock utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll.¹²

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/T/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>S.aureus</i> ATCC 6538 eller 25923	35 °C / 18–24 timmar / A	tillväxt med gula kolonier och gul halo
<i>S.epidermidis</i> ATCC12228	35 °C / 18–24 timmar / A	tillväxt med små färglösa kolonier med violett halo
<i>P.mirabilis</i> ATCC 12453	35 °C / 18–24 timmar / A	delvis hämmad
<i>E.coli</i> ATCC 8739	35 °C / 68–72 timmar / A	hämmad

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

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov från alla partier av dehydrerad mannitolagar för produktivitet och selektivitet genom att jämföra resultaten med ett tidigare godkänt referensparti.

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med målstammen *S.aureus* ATCC 6538: Mannitol Salt Agar-plattor inokuleras med decimala utspädningar i saltlösning av en kolonisuspension och inkuberas vid 35 °C i 18–24 timmar. Kolonierna räknas på båda satserna och produktivetsförhållandet (*Pr*) beräknas. Om *Pr* är $\geq 0,7$ och om koloniernas morfologi och färg är typiska (gula eller vita kolonier med gul halo) anses resultaten vara acceptabla och överensstämmer med specifikationerna. Dessutom testas produktivetskaraktistika genom semikvantitativ ekometrisk teknik med följande målstammar: *S.aureus* ATCC 25923, kliniskt isolat *S.aureus* och *S.epidermidis* ATCC 12228. Kolonier av mannitolfermenterare är vita/gula med en gul zon; kolonier av mannitolfermenterare (*S.epidermidis*) är vita med en violett halo. Tillväxten på plattorna efter inkubation utvärderas och ska vara jämförbar i båda satserna.

Selektiviteten utvärderas med modifierad Miles-Misra-ytdroppmetod genom att inokulera plattorna med decimala utspädningar i saltlösning från 10^{-1} till 10^{-4} av en 0.5 McFarland-suspension av icke-målstammarna *E.faecalis* ATCC 29212, *E.coli* ATCC 8739 och *P.mirabilis* ATCC 12453. Efter inkubation i 24–72 timmar hämmas tillväxten av icke-målstammarna *E.faecalis* och *E.coli* vid utspädningen 10^{-1} och tillväxten av *P.mirabilis* hämmas delvis.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Enterokocker kan uppvisa tillväxt och lätt mannitolfermentering; men katalastest och Gram-morfologi bör kunna skilja de två släktena åt.¹³
- Några få stammar av *S.aureus* kan uppvisa fördröjd mannitolfermentering; negativa plattor bör inkuberas ytterligare 24 timmar innan de kasseras.¹³
- En misstänkt *S.aureus*-stam måste bekräftas genom koagulastest. Odlas kolonierna på en icke-hämmande agar för att utföra testet.
- Mannitol Salt Agar är ett selektivt medium för isolering av patogena *S.aureus*-stammar när distinkta kolonier observeras efter 24 timmars inkubation. Om inkubationen pågår i 48 timmar kan dock även *Micrococcus*-, *Bacillus*-samt vissa *Serratia*-stammar växa.¹³
- Mediefärgförändringen visar mannitolfermentering, inte koloniens färg. Detta är särskilt viktigt eftersom många mikrokocker är pigmenterade.⁶
- Det finns rapporter om att vissa koagulasnegativa stafylokocker kan bilda gula kolonier med gul zon på mannitolsaltagar.¹⁴
- Vissa målorganismer (potentiellt patogena *Staphylococcus*-stammar) kan hämmas på detta medium. Känsligheten hos den beskrivna proceduren varierar beroende på de kliniska proverna, mängden konkurrerande icke-målorganismer och antalet målorganismer. Om det är nödvändigt att detektera alla potentiella patogener är det lämpligt att även använda ett icke-selektivt och icke-differentiellt medium tillsammans med mannitolsaltagar.
- För detektion av meticillinresistenta *Staphylococcus aureus*-stammar (MRSA) bör mer exakta detektionsmetoder, såsom molekylära tekniker, användas.
- Även om mikroorganismkolonierna på plattorna differentieras på basis av deras morfologiska och kromatiska egenskaper, rekommenderas det att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från ren odling för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolknigen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Det här är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Den ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Uttorkade medier måste hanteras med lämpligt skydd. Mannitol Salt Agar är klassificerat som icke-farligt. Konsultera säkerhetsdatabladet före användning.





- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren *före* och *efter slakt* samt under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik 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.
- Tillämpa god tillverkningsssed vid beredningen av pläterade eller flaskförpackade medier.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- 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 berörda myndigheter om 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 alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djurska organ, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

15 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

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 produkten efter detta datum. Undvik att öppna flaskan på fuktiga platser. Efter användning måste behållaren stängas ordentligt. Kassera produkten om behållaren och/eller locket är skadade, eller om behållaren inte är väl tillsluten, eller vid uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, hårdning, stora klumpar). Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och för valideringen av giltighetstiden för de färdiga produkterna, beroende på typ (plattor/flaskor) och tillämpad förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Gordon, M. H. 1903-04. Reports of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. Local British Government Board, Rept. Med. Officer. 33:388-430.
2. Koch, F. E. 1942. Electivnährboden für Staphylokokken. Zentr. Bakt. Parasitenk. I Orig.149:122–124.
3. Chapman, G. H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J.Bacteriol. 50:201-203.
4. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneve: World Health Organization.
5. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
6. Shields P, Tsang AY. Mannitol salt agar plates protocol. American Society for Microbiology (ASM), October 9, 2006.
7. European Pharmacopoeia, current edition
8. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 23 Microbiological Methods for Cosmetics. July 2017
9. ISO 22718:2015 Cosmetics –Microbiology- Detection of Staphylococcus aureus
10. Becker K, Skow R, Von Eiff C. Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase Positive Cocci. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.354
11. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
12. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
13. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
14. Thakur P, Nayyar C, Tak V, Karnika Saigal K. Mannitol-fermenting and tube coagulase-negative staphylococcal isolates: unraveling the diagnostic dilemma. J Lab Physicians 2017; 9(1):65–66.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF Katalognummer	eller REF	 LOT Batch-kod	 IVD Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik	 Tillverkare	 Använd senast
 Temperaturbegränsning		 Innehållet räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Förvara skyddat från direkt ljus	 Förvaras torrt

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll	2020/05
Revidering 3	Ändringar i "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet".	2022/01
Revidering 4	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04
Revidering 5	Förde in SDS-indikationer	2024/02
Revidering 6	Uppdaterade SDS-indikationer	2024/05

Anmärkning: mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar inkluderas inte i granskningshistoriken.

