

**ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER****TRYPTIC SOY AGAR****Dehydrerat odlingsmedium***Bacillus cereus* på Tryptic Soy Agar**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Medium för allmänt bruk för odling och underhåll av icke-fastidiösa och måttligt fastidiösa mikroorganismer. För mikrobiell räkning av icke-sterila farmaceutiska produkter och kosmetika. Tryptic Soy Agar kompletteras med defibrinerat djurblod och är avsett för isolering och odling av snabba och icke snabba mikroorganismer från kliniska prover och andra material samt för bestämning av hemolytiska egenskaper.

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

Pankreatisk nedbrytning av kasein	15 g
Sojapepton	5 g
Natriumklorid	5 g
Agar	15 g

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

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Tryptic Soy Agar (TSA) är ett av de mest använda odlingsmedierna inom klinisk och industriell mikrobiologi. TSA har en mängd användningsområden i kliniska och icke-kliniska laboratorier, inklusive isolering, odling och rening av kolonier av icke-fastidiösa och måttligt fastidiösa mikroorganismer samt underhåll av stamkulturer.¹ Eftersom det inte innehåller X- och V-faktorerna är det lämpligt för identifiering av *Haemophilus* sp. genom att man på agarytan lägger skivor eller remsor impregnerade med X- (Hemin) och V- (NAD) faktorer.² Det rekommenderas som referensmedium vid testning av selektiva medier för att mäta graden av hämning.³ TSA är det medium som specificeras som "casein soya bean digest agar" i den harmoniserade EP, USP JP-metoden³ för mikrobiell räkning av icke-sterila farmaceutiska produkter. Det rekommenderas av ISO Standard 21149 för räkning och detektion av aeroba mesofila bakterier i kosmetika⁵. Tryptic Soy Agar kan kompletteras med defibrinerat djurblod (i koncentrationer mellan 5% och 7%) för att ge ett mer näringsrikt medium för tillväxt av snabba organismer. Tillsats av djurblod möjliggör bestämning av bakteriella hemolytiska egenskaper, vilket är ett användbart verktyg för orientering av bakterieidentifiering.

TSA kan kompletteras med 0,7 g/L lecitin och 5 g/L polysorbat 80, som neutraliserar aktiviteten hos kvartära ammoniumföreningar och andra desinfektionsmedel, för bestämning av effekten av desinficering av produkter, sanitetsutrymmen och behållare.⁶

Tryptic Soy Agar med tillsats av salt kan vara till hjälp vid bestämning av halotoleransnivån hos mikroorganismer.⁶

Tryptic Soy Agar bereds med utvalda kasein- och sojapeptoner: kombinationen av kasein- och sojapeptoner gör mediet näringsrikt genom att tillföra organiskt kväve i form av aminosyror och polypeptider. Natriumklorid bibehåller den osmotiska balansen. Agar är solidifieringsmedlet.

4 – ANVISNINGAR FÖR BEREDNING AV MEDIUM

Lös upp 40 g i 1 000 ml kallt renat vatten. Värm till kokning under kraftig omrörning och sterilisera genom autoklivering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl till 47–50 °C. Blanda väl och håll upp i sterila petriskålar.

Anmärkning. Mediet kan också fördelas i rör före sterilisering och kylas i lutande läge. För beredning av blodplattor, tillsätt 5–7 % defibrinerat djurblod till det medium som autoklaverats och kylts till 47–50 °C, blanda väl och fördela i sterila petriskålar.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Dehydratiserat medium utseende

ljusgult, fint, homogent, fritt flytande pulver

Lösningens utseende

ljusgul, klar

Slutligt pH vid 20–25 °C

7,3 ± 0,2

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Tryptisk sojaagar	Dehydrerat medium	4021502 4021504	500 g (12,5 L) 5 kg (125 L)

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Autoklav, vattenbad, sterila slingor, nålar och bomullsspinnar, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, petriskålar, mikrobiologiska rör, erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna. Vid behov defibrinerat djurblod.

8 – PROVER

Tryptic Soy Agar utan tillsats bör inte användas för direkt inokulering av kliniska prover. I allmänhet används TSA för subkultur av mikroorganismer som odlats på andra odlingsmedier. Icke-kliniska prover som analyseras med Tryptic Soy Agar inkluderar icke-sterila farmaceutiska produkter och kosmetika. Se den citerade litteraturen för provtagning och beredning.^{4,5}

Om de hållda plattorna kompletteras med djurblod kan de direkt inokuleras med många kliniska prover som samlats in från olika normalt sterila och icke-sterila platser hos människor. Se den citerade litteraturen för prover relaterade till specifika infektioner.^{7–9} Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt och tillämpa god laboratoriepraxis för insamling, transport och förvaring av de kliniska proverna; konsultera lämpliga referenser för ytterligare information.⁷





9 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna eller rören anta rumstemperatur och låt ytan på mediet torka.

För subkultur av kolonier, inokulera med hjälp av en steril nål eller ögla en icke-supplerad TSA-platta med en koloni som odlats på ett annat isoleringsmedium. Användaren ansvarar för att välja lämplig inkubationstid, temperatur och atmosfär beroende på den inokulerade organismen och de lokala tillämpliga protokollen.

Vid användning av TSA kompletterat med defibrinerat djurblod, stryk det kliniska provet med en ögla över plattans fyra kvadranter för att erhålla välisolerade kolonier, 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 vid 35–37 °C i aeroba förhållanden med eller utan 5–10 % CO₂, och registrera resultaten efter 18–24, 48 och vid behov 72 timmar.

För mikrobiell räkning i icke-sterila farmaceutiska produkter och kosmetika hänvisas till referenserna.^{4,5}

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubering indikeras förekomsten av mikroorganismer genom att kolonier av olika morfologi och storlek uppträder på ytan av det icke-supplerade mediet. Tillväxtens egenskaper är nära förknippade med typen eller typerna av odlade mikroorganismer.

Genom odling på agarplattor med fårblod som beretts med Tryptic Soy Agar kan bakterier särskiljas baserat på deras förmåga att utsöndra hemolysiner. Hemolysen orsakar en klar zon i blodagarn runt kolonierna. Bakterier kan orsaka olika typer av hemolys:

1. α -hemolys: partiell hemolys av de röda blodkropparna som ger en gröngrå eller brunaktig missfärgning runt kolonierna.
2. β -hemolys: fullständig hemolys av röda blodkroppar som resulterar i en klar zon runt kolonierna
3. γ eller icke-hemolys: ingen hemolys av röda blodkroppar, ingen förändring av mediet under och runt kolonierna.
4. α -prime hemolys: en liten zon med fullständig hemolys som omges av ett område med partiell lys med grön missfärgning; denna typ av hemolys är ovanlig.

11 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkterna släpps för försäljning efter att kvalitetskontrollen 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. Här nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontroll av medium utan tillsats.

KONTROLLSTAMMAR		INKUBATIONSTEMPERATUR/t/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
<i>S.aureus</i>	ATCC 25923	35–37 °C / 18–24 timmar / A	god tillväxt
<i>E.coli</i>	ATCC 25922	35–37 °C / 18–24 timmar / A	god tillväxt

Användarens kvalitetskontroll av TSA som används för mikrobiell räkning i icke-sterila farmaceutiska produkter och kosmetika bör uppfylla kraven i EP⁴ och ISO-standard⁵
A: aerob inkubation; ATCC är varumärke som står för American Type Culture Collection

12 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps för försäljning skall ett representativt prov av alla partier av dehydrerad Tryptic Soy Agar (Test Batch: TB), utan tillsats och med tillsats av defibrinerat fårblod, testas för produktivitet och hemolytiskt mönster genom att resultaten jämförs med ett tidigare godkänt referensparti (Reference Batch: RB).

Produktiviteten hos TSA utan tillsats testas genom ett kvantitativt test med följande stammar: *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 25922, *B.cereus* ATCC 11778, *B.subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 25923, *L.monocytogenes* ATCC 13932, *C.albicans* ATCC 10231, *A.brasiliensis* ATCC 16404. Tryptic Soy Agar-plattor inokuleras med decimala spädningar i saltlösning av kolonisuspensionerna och inkuberas vid 30–35 °C i 24–72 timmar. Kolonierna räknas på båda satserna och produktivitetsförhållandet ($Pr = CFU_{TB}/CFU_{RB}$) beräknas. Om Pr är $\geq 0,7$ och om koloniernas morfologi är typisk, anses resultaten vara acceptabla och överensstämmer med specifikationerna.

Produktiviteten hos TSA som kompletterats med 5 % defibrinerat fårblod testas med semikvantitativ ekometrisk teknik med följande stammar: *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 12386, *S.aureus* ATCC 25923. Efter inkubering vid 35–37 °C i 18–24 timmar utvärderas och registreras typen av hemolys och mängden tillväxt. Alla stammar uppvisar en god tillväxt med typiskt hemolytiskt mönster.

13 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Vid användning av TSA med blodtillsats, beroende på vilka prover som analyseras och vilka mikroorganismer som testas, för undersökning av kliniska prover, rekommenderas att även andra medier används, t.ex. selektiva medier och Chocolate Agar.
- Tillväxt och typ av hemolys beror på organismernas metaboliska krav; det är möjligt att vissa stammar inte växer och/eller kan uppvisa andra hemolytiska mönster än de förväntade.
- *Haemophilus influenzae*, som kräver både faktor X och faktor V, växer inte på detta medium som kompletterats med fårblod¹⁰; *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Bordetella* och andra mikroorganismer med mycket specifika näringsbehov växer inte tillräckligt; för påvisande av dessa organismer bör specifika odlingsmedier användas.
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska, kromatiska och hemolytiska egenskaper, rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolat från renkultur för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför test av antimikrobiell känslighet.
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningen 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. 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 tillverkningssed vid beredningen av odlingsmedier på plattor, i rör eller flaskor.
- 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 skadat, om behållaren inte är ordentligt försluten eller om pulvret uppvisar tydliga tecken på försämring (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/rör/flaskor), tillsatta supplement och tillämpad förvaringsmetod (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Atlas R. Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition CRC Press, 1997
2. Ledebor NA, Doern GV. Haemophilus. In Jorgensen JH, Carroll KC, Tenover FC, Tenover FC editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.667.
3. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media
4. European Pharmacopoeia, current edition
5. ISO 21149:2017. Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carroll KC, Tenover FC, Tenover FC editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
8. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneva: World Health Organization.
9. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
10. Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood Agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus Influenzae from sputum. Bacterial Methods Evaluation Group J Med Microbiol 48 (12), 1111-1114 Dec 1999

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 1	Uppdaterad layout och innehåll	2020/06
Revidering 2	Ändringar i "försiktighetsåtgärder och varningar" och "förvaringsförhållanden och hållbarhet".	2021/11
Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

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

