

**ANVÄNDNINGSANVISNING****VCNT ANTIMICROBIC SUPPLEMENT****Frystorkat selektivt tillskott****1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostik. Blandning av antimikrobiella medel som tillsätts odlingsmedier för att möjliggöra selektiv isolering av *Neisseria gonorrhoeae* från kliniska prover.

2 – SAMMANSÄTTNING, TYPISK FORMEL***INNEHÅLL I AMPULL FÖR 500 ML MEDIUM**

Vankomycin	1,50 mg
Kolistin	3,75 mg
Nystatin	6250 IE
Trimetoprim	2,5 mg

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

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

1964 formulerade Thayer och Martin¹ ett selektivt medium för odling av *Neisseria gonorrhoeae* och *Neisseria meningitidis*, genom att tillsätta hemoglobin, jästtillskott B, polymyxin B och ristocetin i GC-agar. Thayer och Martin förbättrade 1966² formuleringen genom att ersätta de ursprungliga antibiotika med vankomycin, kolistin och nystatin (VCN). 1970 modifierade Martin och Lester³ det nya Thayer-Martin-mediet genom att öka agar- och glukosinnehållet och genom att tillsätta ytterligare ett antibiotikum, trimetoprimlaktat. Detta förbättrade medium kallas modifierat Thayer-Martin-medium (MTM).

VCNT Antimicrobial Supplement är en frystorkad blandning av antimikrobiella medel som används som tillskott till GC-mediet Base för selektiv isolering av *Neisseria gonorrhoeae*.

Vancomycin hämmar grampositiva kontaminanter, kolistin hämmar gramnegativa bakterier, inklusive *Pseudomonas*-arter och nästan alla saprofytiska *Neisseria* spp, nystatin är ett svampdödande medel och trimetoprim hämmar svärmning av *Proteus*.

4- ANVISNINGAR

Rekonstituera innehållet i en ampull aseptiskt med 5 ml steril renat vatten och blanda försiktigt för att lösa upp. Använd det rekonstituerade tillskottet för beredning av modifierat Thayer-Martin-medium (MTM) enligt beskrivningen nedan.

Suspendera 19 g GC Medium Base (REF 401520) i 500 ml kallt renat vatten; koka upp under ständig omrörning och sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl till 47–50 °C och tillsätt aseptiskt 5 % defibrinerat fårblod och värm i vattenbad vid 80 °C i 15 minuter. Kyl till 47–50 °C och tillsätt:

- innehållet i en ampull Biovitex rekonstituerat med 5 ml återställningsvätska (ref. nr 4240009).
- innehållet i en flaska VCNT Antimicrobial Supplement rekonstituerat enligt beskrivningen ovan.

I stället för fårblod kan GC medium Base kompletteras med steril bovin hemoglobinlösning: 5 g bovin hemoglobin i 250 ml vatten steriliserat genom autoklavering + 250 ml autoklavert GC Medium Base i dubbel koncentration.

Blanda väl och fördela i sterila plattor.

Slutligt pH för komplett medium: 7,2 ± 0,2.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

Utseende på frystorkad produkt kort, kompakt, gul pastill

Utseende på rekonstituerad produkt gul, grumlig lösning

6 - MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
VCNT Antimicrobial Supplement	Tillsats för odlingsmedier	4240008	10 flaskor, vardera för 500 ml komplett medium. Sekundärförpackning: kartong

7 - MATERIAL SOM KRÄVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

GC Medium Base (REF 401520) eller annat lämpligt medium, bovin hemoglobin eller defibrinerat fårblod, berikningstillsetser Biovitex (ref 4240009) autoklav, vattenbad, inkubator och annan laboratorieutrustning. Kolvar, sterila plattor och rör, öglor och sterila svabbprover för mikrobiologi, material för att skapa en kontrollerad inkubationsatmosfär med CO₂ eller CO₂ inkubator med luftfuktare, tillbehör till odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonier.

8 – PROVER

Plattor med modifierat Thayer-Martin-medium (MTM) kan direkt inokuleras med prover från icke-sterila humana ställen som är kontaminerade med blandad flora av bakterier och/eller svampar (t.ex. urogenitala organ, övre luftvägar, pus och exsudat).^{4,6} Detta medium är inte användbart för isolering av *Neisseria* spp. från förmodat sterila ställen.⁷

God laboratorie sed för insamling, transport och förvaring av kliniska prover bör tillämpas. Konsultera lämpliga referenser för ytterligare information, eftersom *Neisseria* spp. är mycket känsliga för insamlings- och förvaringsprocedurer.⁴

9 – TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna nå rumstemperatur. Agarens yta ska vara slät och fuktig, men utan överflödigt vatten.

Bearbeta provet så snart som möjligt efter att det har mottagits i laboratoriet för att undvika förlust av gonokockers livskraft och överväxt av kontaminanter.

Rulla svabben över en kvadrant av ytan och stryka sedan provet över de andra kvadranterna på plattan för att få väl isolerade kolonier, och se till att sektionerna 1 och 4 inte överlappar varandra.

Eftersom svabbprover för gonokockodling kan innehålla endast ett litet antal organismer kan man alternativt rulla svabbarna direkt på mediet i ett stort Z-mönster för att överföra provet i tillräcklig mängd. Stryk sedan ett korsmönster över Z-mönstret med en steril ögla.





Inkubera vid 35–36,5 °C i en fuktig atmosfär med 3–7 % CO₂ ; odlingarna ska undersökas dagligen med avseende på tillväxt och förvaras i högst 72 timmar.

10 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation observera bakterietillväxten och notera koloniernas specifika morfologiska och kromatiska egenskaper. *N.gonorrhoeae*-kolonier varierar i storlek, är vanligtvis små (0,5–2 mm), måttligt konvexa, upphöjda, korniga, glänsande, fuktiga, med hela till filikiga kanter, vanligtvis gråvita till genomskinliga; nästan alla stammar blir slemliga efter 48 timmar. Gramfärgning måste utföras på misstänkta *Neisseria*-kolonier för att bekräfta förekomsten av enhetliga gramnegativa diplokokker. Oxidastest är obligatoriskt för kolonier som misstänks tillhöra *Neisseria* och som ska vara positiva för *N. gonorrhoeae*.

11 – ANVÄNDARKVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av produkten släpps 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.⁸

KONTROLLSTAMMAR	INKUBATIONSTEMPERATUR/T/ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
Modifierat Thayer-Martin-medium		
<i>N.gonorrhoeae</i> ATCC 4306	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	god tillväxt
<i>P.mirabilis</i> ATCC 43071	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	hämmad
<i>E.coli</i> ATCC 25922	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	hämmad
<i>N.sicca</i> ATCC 9913	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	tillväxt delvis hämmad
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	hämmad
<i>C.albicans</i> ATCC 60193	35-36,5 °C / 24-48 timmar / CO ₂	tillväxt delvis hämmad

ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection

12- PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt urval av alla partier av VCNT Antimicrobial Supplement med avseende på produktivitet och selektivitet med modifierade Thayer-Martin-plattor. Produktiviteten testas med hjälp av en semikvantitativ ekometrisk teknik med två gonokockstammar: *N.gonorrhoeae* ATCC 43069 och *N.gonorrhoeae* ATCC 19424. Efter inkubation vid 35–36,5 °C i 24–48 timmar, med 3–7 % CO₂, utvärderas och registreras tillväxtmängden. Alla stammar uppvisar god tillväxt med typisk morfologi. Selektiviteten utvärderas med modifierad Miles-Misra- ytdroppmetod genom att inokulera plattorna med lämpliga decimala utspädningar i saltlösning av en 0,5 McFarland-suspension av icke-målorganismerna *N.sicca* ATCC 9913, *S.epidermidis* ATCC 12228, *E.coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* ATCC 43071, *P.rettgeri* ATCC 39944, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 19433 och *C.albicans* ATCC 60193. Efter inkubation vid 35–36,5 °C i 24–48 timmar, med 3–7 % CO₂, hämmas tillväxten av icke-målstammar.

13 - METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Vancomycinkänsliga stammar av vissa auxotyper av *N. gonorrhoeae* som inte växer på MTM har rapporterats utgöra 3–10 % av det totala antalet isolat.^{9,10} Vissa gonokocker är också känsliga för trimetoprim.¹¹
- Det rekommenderas att både ett selektivt och ett icke-selektivt medium används vid isolering av patogena *Neisseria* för att undvika förlust av vankomycin- och/eller trimetoprimkänsliga stammar.⁷
- MTM är inte användbart för isolering av *Neisseria* spp. från förmodat sterila ställen som cerebrospinalvätska, konjunktival svabb, hudbiopsi, ledvätska, för vilka icke-selektiva medier rekommenderas.⁷
- För tillväxt av *N. gonorrhoeae* är det nödvändigt att plattornas yta är fuktig. Om den verkar torr, fukta den med några droppar sterilt destillerat vatten. Placera fuktig gasväv eller pappershanddukar i CO₂-behållaren före inkubation eller använd en inkubator med luftfuktare.⁷
- På MTM växer *N. gonorrhoeae* med mindre och mer korniga kolonier än på icke-selektiv chokladagar.
- Vissa saprofytiska icke-målmikroorganismer, som är resistent mot antimikrobiella medel i mediet, kan växa. *N. lactamica* kan växa på MTM med kolonier som är mindre och mindre fuktiga än gonokocker, ibland med en gulaktig nyans.⁷
- Gonokocker är en av de mest ömtåliga gramnegativa bakterierna. Det rekommenderas att alla prover som misstänks innehålla *Neisseria* odlas på primärt isoleringsmedium omedelbart efter provtagningen för att undvika förlust av livskraft och/eller överväxt av kontaminanter. Om detta inte är möjligt bör *N. gonorrhoeae*-svabbprover förvaras vid 4–6 °C i högst 3 timmar.⁷
- Inkubatorns temperatur bör ställas in på 35–36,5 °C¹² eftersom många stammar av *N. gonorrhoeae* inte växer bra vid 37 °C.^{7,12}
- Undersök plattorna efter 24 timmars inkubation. Efter 48 timmar kan Gram-morfologin uppvisa atypiska former.
- Många standardprotokoll^{13–15} beskriver användningen av modifierat Thayer-Martin-medium för detektion av meningokockbärande orofaryngeala och nasofaryngeala svabbprover. Denna tillämpning ligger utanför den avsedda användningen av GC-medium bas kompletterat med Biovitex- och VCNT-tillsatser. Slut användaren bör validera denna tillämpning innan dessa selektiva medier används rutinmässigt för detektion av *N. meningitidis* i kliniska prover.
- Använd dacron- eller kalciumalginatpinnar för provtagning, undvik bomullspinnar eftersom de innehåller fettsyror som hämmar *N. gonorrhoeae*.⁷
- Felaktig provtagning, inkubationstemperatur, CO₂ nivå, fuktighet och pH kan påverka mikroorganismernas tillväxt och livskraft negativt.
- Inaktivering eller försämring av antibiotika i selektiva medier kan möjliggöra tillväxt av kontaminanter.
- Det rekommenderas att mäta pH-värdet i kompletta medier. GC Medium Base har tillräcklig buffertkapacitet, men ibland kan det vara nödvändigt att justera det slutliga pH-värdet.
- 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 relevant, utför antimikrobiell känslighetstestning.
- VCNT-tillskottet och de beredda medierna är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar. Tolkningsresultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

14 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR





- VCNT Antimikrobiellt tillskott är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt test, endast avsett för professionellt bruk. Det måste användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal, som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- VCNT Antimicrobial Supplement klassificeras som farligt enligt gällande europeisk lagstiftning. Läs säkerhetsdatabladet före användning.
- Tillägget och mediet ska användas tillsammans enligt anvisningarna ovan. Tillämpa god tillverkningssed vid beredningen av pläterade medier.
- VCNT Antimicrobial Supplement steriliseras genom membranfiltrering.
- Var försiktig när du öppnar metallringen för att undvika skador.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar såsom mediumpulver och tillskott eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt farligt avfall före bortskaffande. Kassera oanvända tillskott och steriliserade medier som inokulerats med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte VCNT Antimicrobial Supplement som aktiva ingredienser i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsett för konsumtion av människor och djur.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet för produkterna 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 sammanställts efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten, men utan skyldighet eller ansvar. I alla fall måste gällande lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som tagits från mänskliga och djuriska organ, 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 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Vid mottagandet ska produkten förvaras i originalförpackningen vid 2–8 °C och skyddas från direkt ljus. Om produkten förvaras på rätt sätt kan den användas fram till det utgångsdatum som anges på etiketten. Använd inte produkten efter detta datum. När flaskan har öppnats och den frystorkade produkten har rekonstituerats ska den resulterande lösningen användas omedelbart. Innan användning ska den frystorkade och rekonstituerade produkt en undersökas och kasseras om det finns tydliga tecken på försämring (t.ex. kontaminering, atypisk färg eller andra onormala egenskaper).

Användaren ansvarar för tillverknings- och kvalitetskontrollprocesserna för beredda medier och valideringen av deras hållbarhetstid, beroende på typ (plattor/rör) och tillämpade förvaringsförhållanden (temperatur och förpackning).

16 – REFERENSER

1. Thayer JD, Martin JE. A selective medium for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Pub. Health Rep.* 1964; 79:49.
2. Thayer JD, Martin JE. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Pub. Health Rep.* 1966; 81:559-562.
3. Martin JE Jr, Lester A. Transgrow, a medium for transport and growth of *N. gonorrhoeae* and *N. Meningitidis*. *HSMHA Health Service Rep.* 1971; 86:30
4. 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.
5. Public Health England: Standards for microbiology investigations (UK SMI)- *Bacteriology* : UK SMI B2:2017, UK SMI B9:2015, UK SMI B14:2016; UK SMI B28:2017; B51:2014
6. Elias J, Frosh M, Vogel U. *Neisseria*. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.635.
7. MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
8. CLSI (formerly NCCLS) *Quality Control of Commercially Prepared Culture Media*. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004 Talbot V. et al. Vancomycin sensitive penicillinase producing *Neisseria gonorrhoea*. *Br.J Ven Dis.* 1983; 59:277
9. Talbot V. et al. Vancomycin sensitive penicillinase producing *Neisseria gonorrhoea*. *Br.J Ven Dis.* 1983; 59:277
10. Mirret S, Reller B, Knapp JS. *Neisseria gonorrhoeae* Strains inhibited by vancomycin in selective media and correlation with auxotype. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 94
11. Lai-King Ng, Martin IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005; 16(1): 15–25.
12. CDC: *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. Screening Tests To Detect Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infections Recommendations and Reports*. October 18, 2002 / Vol. 51 / No. RR-15
13. CDC Lab Manual, meningitides; Annex: Preparation of Media and Reagents, 2016
14. Elias J, Frosh M, Vogel U. *Neisseria*. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.635.
15. Public Health England: Standards for microbiology investigations (UK SMI)- *Bacteriology*: UK SMI B2:2017, UK SMI B9:2015, UK SMI B14:2016; UK SMI B28:2017; B51:2014

VCNT ANTIMIKROBIELLT TILLSKOTT REF 4240008

SDS

Förordning (EU) 2020/878

Klassificering

Produkten är klassificerad som farlig. Produkten kräver därför ett säkerhetsdatablad som uppfyller bestämmelserna i (EU) förordning 2020/878.

Akut toxicitet, kategori 4 H302 Skadligt vid förtäring.

Hudsensibilisering, kategori 1 H317 Kan orsaka allergisk hudreaktion.

Märkning

Fara-piktogram:





Signalord: Varning
Faroklassificering:
H302 Farligt vid förtäring.
H317 Kan orsaka allergisk hudreaktion.
Försiktighetsåtgärder:
P280 Använd skyddshandskar.
P261 Undvik inandning av damm/rök/gas/dimma/ångor/spray.
P333+P313 Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.
P264 Tvätta . . . noggrant efter hantering.
P362+P364 Ta av förorenade kläder och tvätta dem innan de används igen.
Innehåller: VANCOMYCIN HCL-COLISTIN

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

 REF eller REF Katalognummer	 LOT Batchkod	 IVD <i>In vitro</i> -diagnostisk medicinteknik . . .	 Tillverkare	 Denna sida	
 Temperaturbegrensning	 Innehåll som räcker till <n> tester	 Se bruksanvisningen	 Använd före	 Förvaras skyddat från direkt ljus	 Omtåligt

REVISIONSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringar	Datum
Revision 1	Uppdaterad layout och innehåll	2021/12
Revision 2	Borttagande av föråldrad klassificering	2023/04

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

