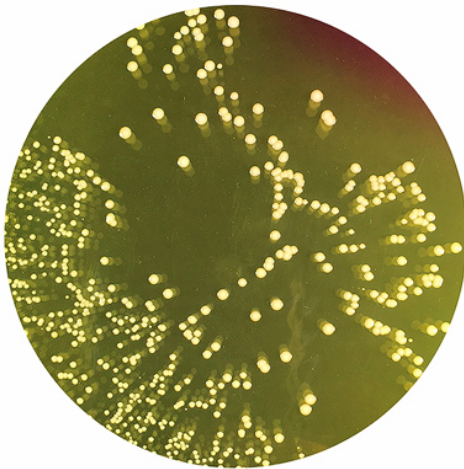




ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

MANNITOL SALT AGAR

Färdiga plattor

Mannitol Salt Agar: *S.aureus*-kolonier**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

Produkt för *In vitro*-diagnostik. Selektivt medium för isolering och differentiering av stafylokocker från kliniska och icke-kliniska prover.

2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING *

Pankreasdigerering av kasein	5,000
Pankreasdigerering av djurvävnad	5,000
Jästextrakt	1,000
Natriumklorid	75,000
Mannitol	10,000
Fenolrött	0,025
Agar	15,000

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

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 °C–37 °C. De är fakultativa anaerober 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 fermentering av mannitol kunde användas som ett medel för att skilja patogena från icke-patogena stafylokocker, och av Koch² som upptäckte att närvaron av 7,5 % natriumklorid i odlingsmediet hämmade tillväxten av de flesta organismer utom stafylokocker. Chapman³ använde denna information för att formulera fenolrött 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 – FYSISKA EGENSKAPER

Medelstort utseende	rödviolett, klar
Slutligt pH vid 20–25 °C	7,4 ± 0,2

5 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
Mannitol Salt Agar	Färdiga plattor	541665	2 x 10 plattor ø 90 mm Primär förpackning: 2 cellofanpåsar Sekundär förpackning: kartong

6 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Sterila öglor och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

7 – PROVER

Mannitol Salt Agar är avsett för bakteriologisk undersökning av humana kliniska prover från kontaminerade källor, såsom avföring, material från luftvägarna, purulenta exsudat, sår, abscesser^{4,5,10} och icke-kliniska prover, såsom icke-sterila läkemedel och kosmetika^{8,9}. God laboratoriesed 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}.

8 – 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 bomullspinnen 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.

9 – 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

10 – 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. 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	
<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

11 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt urval av alla partier av färdiga plattor med mannitolsaltagar och av råmaterialet som används för tillverkningen av färdiga plattor (dehydrerad mannitolagar REF 401665) med avseende på produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs 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 överensstämna med specifikationerna. Dessutom testas produktivetskaraktäristika 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 jämförbara 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.

12 – 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. Odlå 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*- och *Bacillus*-stammar växa.¹³
- Mediefärgförändringen visar mannitolfermentering, inte kolonifärg. Detta är särskilt viktigt eftersom många mikroocker 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 rekommenderas att man använder ett icke-selektivt och icke-differentiellt medium tillsammans med Mannitol Salt Agar.
- 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. Tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten från andra diagnostiska tester.

13 – 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.
- Denna produkt är inte klassificerad som farlig enligt gällande lagstiftning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontroller av djuren före och efter slakt samt kontroller under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att dessa produkter inte innehåller några överförbara patogener. Därför rekommenderas att de färdiga plattorna behandlas som potentiellt smittsamma och hanteras med iakttagande av de vanliga specifika försiktighetsåtgärderna: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE-uttalandet från webbplatsen www.biolifeitaliana.it, som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana S.r.l. har vidtagit för att minska risken för smittsamma djursjukdomar.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Varje platta med detta odlingsmedium är endast avsedd för engångsbruk.





- Färdiga plattor ska inte betraktas som en "steril produkt" eftersom de inte genomgår slutsterilisering, utan som en produkt med kontrollerad biologisk kontaminering, inom gränserna för de specifikationer som anges i kvalitetskontrollcertifikatet.
- Sterilisera allt biologiskt riskavfall innan det kasseras. Kassera oanvänt medium och plattor som har inokulerats med prover eller mikroorganismer i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- 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 djuriska 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.

14 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvara plattorna i originalförpackningen vid 2–8 °C och skyddade från direkt ljus. Om de förvaras korrekt kan plattorna användas fram till utgångsdatumet. Använd inte plattorna efter detta datum. Plattor från öppnade plastpåsar kan användas i 7 dagar om de förvaras i en ren miljö vid 2–8 °C. Använd inte plattorna om plastpåsen är skadad eller om skålen är trasig. Använd inte plattor som visar tecken på försämring (t.ex. mikrobiell kontaminering, uttorkning, krympning eller sprickbildning i mediet, atypisk färg, överdriven fuktighet).

15 – REFERENSER

- Gordon MH. Reports of some characters by which various streptococci and staphylococci may be differentiated and identified. Local British Government Board, Rept Med Officer 1903-04; 33:388–430.
- Koch FE. Electivnärboden für Staphylokokken. Zentr. Bakt. Parasitenk. I Orig 1942; 149:122–124.
- Chapman GH. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J Bacteriol 1945; 50:201-203.
- 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.
- Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
- Shields P, Tsang AY. Mannitol salt agar plates protocol. American Society for Microbiology (ASM), October 9, 2006.
- European Pharmacopoeia, current edition
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 23 Microbiological Methods for Cosmetics. July 2017
- ISO 22718:2015 Cosmetics –Microbiology- Detection of Staphylococcus aureus
- 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
- 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.
- CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- 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
Temperaturlinje	Temperaturlinje	Innehållet räcker till <n> tester	Se bruksanvisningen	Endast för engångsbruk	Ömtåligt, hantera med försiktighet

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Användningsinstruktioner (IFU) – Revidering 2	Uppdaterad layout och innehåll i enlighet med IVDR 2017/746	2020/05
Revidering 3	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/03

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

