

**ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER****SUPPLEMENTED BRUCELLA AGAR****Färdiga plattor**

Supplemented Brucella Agar:  
*Bacteroides fragilis* och cefoxitin gradientremsa

**1 – AVSEDD ANVÄNDNING**

Produkt för *In vitro*-diagnostik. Odlningsmedium för kvantitativ bestämning av anaeroba bakteriers känslighet för antimikrobiella medel med hjälp av gradientbaserade remsor.

**2 – TYPISK SAMMANSÄTTNING \***

|                  |          |
|------------------|----------|
| Trypton          | 10,0 g   |
| Pepton           | 10,0 g   |
| Jästextrakt      | 2,0 g    |
| Glukos           | 1,0 g    |
| Natriumklorid    | 5,0 g    |
| Natriumbisulfid  | 0,1 g    |
| Agar 15,0 g      |          |
| Vitamin K1       | 1,0 mg   |
| Hemin            | 5,0 mg   |
| Lyserat hästblod | 50,0 ml  |
| Renat vatten     | 1 000 ml |

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

**3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET**

Referenstesterna för antimikrobiell känslighetstestning av anaeroba bakterier är agarutspädningsmetoden och buljongmikroutspädningsmetoden som utvecklats av Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).<sup>1</sup>

Enligt de internationella riktlinjerna är känslighetstestning av anaeroba bakterier mycket kostsamt, tidskrävande och kräver erfaren laboratoriepersonal.<sup>2</sup> För att övervinna dessa begränsningar har vissa metoder baserade på gradientremsatestning utvecklats och finns kommersiellt tillgängliga för laboratorier. Sådana tester baseras på diffusionen av en stabil koncentrationsgradient av ett antimikrobiellt medel från en plast- eller pappersremsa till ett agarmedium.

Det medium som rekommenderas för detektion av MIC för anaeroba med gradientbaserade remsor är Supplemented Brucella Agar med vitamin K1, hem och lyserat häst- eller fårblod.<sup>3</sup> Supplemented Brucella Agar härrör från den formulering som rekommenderas av CLSI för buljongmikroutspädningsmetoder<sup>1</sup> och innehåller lyserat hästblod.

I Supplemented Brucella Agar tillför peptoner och jästextrakt, tillsammans med glukos, kväve, kol och vitaminer för mikrobiell tillväxt. Lyserat hästblod tillför ytterligare näringsämnen. Natriumbisulfid sänker redoxpotentialen till värden som är lämpliga för strikt anaeroba organismer. Både hem och vitamin K1 ökar tillväxten av vissa anaeroba bakterier.

Jämförande studier av gradientremsmetodens prestanda jämfört med CLSI-agarutspädningsmetoden har visat en generellt hög kategorisk överensstämmelse mellan många anaeroba arter och en rad olika antibiotika.<sup>4-8</sup> Gradientremsmetoden kan också användas för detektion av heteroresistens (t.ex. i fallet med imipenemresistens hos *B. fragilis* eller i fallet med metronidazolresistens hos *C. difficile* och *B. fragilis*).<sup>2,9,10</sup>

**4 – FYSISKA EGENSKAPER**

Mediets utseende röd, transparent  
Slutligt pH vid 20–25 °C 7,2 ± 0,2

**5 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING**

| Produkt                    | Typ             | REF    | Förpackning  |
|----------------------------|-----------------|--------|--|
| Supplemented Brucella Agar | Färdiga plattor | 549850 | 2 x 10 plattor ø 90 mm<br>Primär förpackning: 2 cellofanpåsar<br>Sekundär förpackning: kartong |

**6 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS**

Sterila öglo och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, gradientbaserade remsor med antimikrobiella medel.

**7 – PROVER**

Supplemented Brucella Agar måste användas med ren odling av anaeroba isolerade från kliniska prover. Supplemented Brucella Agar är inte avsedd för mikrobiell isolering direkt från kliniska prover.

**8 – TESTFÖRFARANDE**

Låt plattorna och de antimikrobiella gradientremsorna nå rumstemperatur. Agarens yta ska vara torr före användning.

Riktlinjer för beredning av inokulum:

Bered en bakteriesuspension i Brucella-buljong eller Mueller Hinton-buljong med en grumlighet motsvarande 1 McFarland.

Doppa en steril bomullspinne i suspensionen och ta bort överflödigt vätska genom att trycka och vrida pinnen mot insidan av röret.

Plattorna kan inokuleras antingen genom att svabba i tre riktningar eller genom att använda en automatisk plattrotator. Sprid inokulatet jämnt över hela agarens yta och se till att det inte finns några mellanrum mellan strecken.

Så snart inokulatet har absorberats och agarytan är torr, applicera gradientremsorna. Se till att remsorna är i fullständig kontakt med agarytan och får inte flyttas efter att de har applicerats, eftersom den initiala diffusionen av antimikrobiella medel från remsorna är mycket snabb. Remsorna ska placeras på agarplattan på ett sätt som inte resulterar i överlappande hämningszoner.





Riktlinjer för inkubation:

Inkubera vid  $35 \pm 2$  °C i 24–48–72 timmar (beroende på art) i anaerob atmosfär (80–85 % N<sub>2</sub> / 10 % CO<sub>2</sub> / 10 % H<sub>2</sub>).

För detaljer om inokulations- och inkubationsprocedurer, se bipacksedeln från tillverkaren av gradientremsorna.

### 9 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation avläses plattorna från framsidan med locket borttaget och med reflekterat ljus.

Ett korrekt inokulum och tillfredsställande ustrykta plattor bör resultera i en sammanhängande tillväxtmattna. Om enskilda kolonier kan ses är inokulumet för tunt och testet måste upprepas.

Tillväxten ska vara jämnt fördelad över agarytan för att uppnå en enhetlig hämningsellips.

Kontrollera att hämningszonerna för kvalitetskontrollstammen ligger inom acceptabelt intervall.

Bestämning av MIC sker vid den punkt där den nedre delen av bakterietillväxtellipsen skär det motsvarande numret på testremsan.

För specifika instruktioner om avläsning och tolkning, se bipacksedeln från tillverkaren av gradientremsorna.

### 10 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av Supplemented Brucella Agar-plattor 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. Detaljer om testning av QC-organismer beskrivs i tillverkarens bipacksedel.

Minst en QC-stam bör testas för att säkerställa att produkten fungerar korrekt.<sup>4</sup>

En stam och gradientremsa som är användbar för kvalitetskontroll är: *B. fragilis* ATCC 25285 / metronidazol.

Se tolkningsriktlinjerna i bipacksedeln från tillverkaren av testremsorna.

ATCC är ett varumärke som tillhör American Type Culture Collection.

### 11 – PRESTANDAEGENSKAPER

Innan produkten släpps ut på marknaden testas ett representativt prov av alla partier av färdiga plattor med Supplemented Brucella Agar genom antimikrobiell känslighetstestning, som utförs enligt gradientremsans tillverkarens bipacksedel med följande stammar och gradientremsor: *B. fragilis* ATCC 25285 / metronidazol, cefoxitin, bensylpenicillin, imipenem.

Efter inkubation vid 35–37 °C i anaerob atmosfär i 48 timmar avläses MIC-värdena där hämningsellipsen skär MIC-skalans zoner, och mätningarna registreras och utvärderas för att ligga inom de kvalitetskontrollintervall som anges i tillverkarens bipacksedel för remsorna.

### 12 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Felaktig inokulumkoncentration, felaktig förvaring av antimikrobiella remsor, felaktig förvaring av plattorna som resulterar i ett agar-djup och pH utanför specifikationerna, överdriven fuktighet, felaktig mätning av slutpunkter kan ge felaktiga resultat.
- De inokulations-, inkubations- och avläsningsmetoder som beskrivs här ska betraktas som riktlinjer. För att säkerställa tillförlitliga resultat krävs strikt efterlevnad av det protokoll som föreslås av tillverkaren av gradientremsorna.
- Förreduktion av testplattor i en anaerob miljö över natten före användning minskar sannolikheten för falsk resistens.<sup>4</sup>
- Läsning och tolkning kräver expertis och noggrann efterlevnad av tillverkarens anvisningar för gradientremsorna. Ibland kan vissa kombinationer av antibiotika och bakterier ge ovanliga resultat. I dessa fall kan det vara svårt för oerfaren personal att bedöma MIC-slutpunkten.<sup>3</sup>
- Detta odlingsmedium är avsett som ett hjälpmedel vid behandling 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

- Supplemented Brucella Agar är en produkt för kvalitativ *in vitro*-diagnostik, endast avsedd för professionellt bruk. Produkten ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Supplemented Brucella Agar är inte klassificerat som farligt enligt gällande europeisk lagstiftning.
- Detta odlingsmedium innehåller råmaterial av animaliskt ursprung. Kontrollera av djuren *före* och *efter slakt* samt kontrollera under produktions- och distributionscykeln för råvarorna kan inte helt garantera att denna produkt inte innehåller några överförbara patogener. Därför rekommenderas att de färdiga plattorna behandlas som potentiellt smittsamma och hanteras med sedvanliga särskilda försiktighetsåtgärder: förtär inte, andas inte in och undvik kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE Statement från webbplatsen [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it), som beskriver de åtgärder som Biolife Italiana har vidtagit för att minska riskerna i samband med smittsamma djursjukdomar.
- Alla laboratorieprover ska betraktas som smittsamma.
- 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.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar som odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet finns tillgängliga på webbplatsen [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- 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

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 8th ed. CLSI document M11-A9, . Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2012.





- Gajdác M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology. *Antibiotics (Basel)* 2017;6(4):25.
- Etest Application Guide-16273B - en - 2012/07 /Etest IFU 9392553C en 2012/01
- Schuetz A, Carpenter DE. Susceptibility test method: anaerobic bacteria *In*: Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. *Manual of clinical microbiology*, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
- Bolmström A, Karlsson A, Engelhardt A, Phion Ho P, Petersen PJ, Bradford PA, Hal Jones C. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(8):2474-9.
- Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10):2197-203.
- Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995; 22(3):279-84.
- Poulet P, Duffaut D, Lodter JP. Evaluation of the Etest for determining the in-vitro susceptibilities of *Prevotella intermedia* isolates to metronidazole *J Antimicrob Chemother* 1999;43(4):610-1.
- El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial hetero-resistance: An emerging field in need of clarity. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28: 191-207.
- Huang H, Weintraub A, Fang H, Wu S, Zhang Y, Nord CE. Antimicrobial susceptibility and hetero-resistance in Chinese *Clostridium difficile* strains. *Anaerobe* 2010; 16: 633-635.

**TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER**

|                             |                  |                                   |  |                        |                                    |
|-----------------------------|------------------|-----------------------------------|--|------------------------|------------------------------------|
| <b>REF</b><br>Katalognummer | eller <b>REF</b> | <b>LOT</b><br>Batch-kod           | <b>IVD</b><br>Medicinteknisk produkt för <i>in vitro</i> -diagnostik | Tillverkare            | Använd senast                      |
| Temperaturlimitering        |                  | Innehållet räcker till <n> tester | Se bruksanvisningen  | Endast för engångsbruk | Ömtåligt, hantera med försiktighet |

**REVIDERINGSHISTORIK**

| Version                                       | Beskrivning av ändringarna                                  | Datum   |
|---|---|---------|
| Användningsinstruktioner (IFU) – Revidering 1 | Uppdaterad layout och innehåll i enlighet med IVDR 2017/746 | 2021/01 |
| Revidering 2                                  | Borttagning av föråldrad klassificering                     | 2023/03 |

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

