

**ANVÄNDNINGSANVISNING****RPMI AGAR**
Färdiga plattorRPMI-agar: *Candida krusei* och vorikonazol gradientremsa**1 - AVSEDD ANVÄNDNING**

In vitro-diagnostisk produkt. Odlingsmedium för kvantitativ bestämning av känslighet för svampdödande medel med hjälp av gradientbaserade remsor.

2 – SAMMANSÄTTNING – TYPISK FORMEL *

RPMI 1640	10,4 g
MOPS **	34,5 g
Glukos	20,0 g
Agar	15,0 g
Renat vatten	1000 ml

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

** 3-(N-morfolino)propansulfonsyra

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Referenstesterna för antifungal känslighetstestning är buljongmikroutspädningstesterna som utformats av Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹ och av European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST)^{2,3,4}. Dessa referensmetoder är tidskrävande och olämpliga för rutinmässig klinisk laboratorieverksamhet.⁵ För att övervinna dessa begränsningar har vissa metoder baserade på gradientremsor 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 utvecklats för detektion av MIC med gradientbaserade remsor är RPMI 1640 kompletterat med agar, glukos och buffrat med MOPS. Detta medium härrör från den formulering som rekommenderas för buljongmikroutspädningstester.¹ RPMI 1640 utvecklades av Moore, Gerner och Franklin⁶ 1967 vid Roswell Park Memorial Institute, därav namnet. Det innehåller vitaminer, aminosyror, salter, en pH-indikator och används ofta för cellodlingar. När RPMI 1640 kompletterades med MOPS, glukos och agar visade det korrekta MIC-värden med antifungala medel på gradientbaserade remsor, jämförbara med resultaten som erhöles med CLSI-referensmetoden.^{4, 7-11}

4 - FYSISKA EGENSKAPER

Mediumets utseende	rosa, klar
Slutligt pH vid 20–25 °C	7,0 ± 0,2

5 - MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
RPMI agar	Färdiga plattor	54RPMI90	2 x 10 plattor ø 90 mm primärförpackning: 2 cellofanpåsar sekundärförpackning: kartong
RPMI agar	Färdiga plattor	54RPMI15	5 plattor ø 150 mm primärförpackning: cellofanpåse sekundärförpackning: kartong

6 - MATERIAL SOM KRÄVS MEN SOM INTE MEDFÖLJER

Sterila öglor och svabbprover, inkubator och laboratorieutrustning efter behov, gradientbaserade remsor med svampdödande medel.

7 – PROVER

RPMI-agar måste användas med ren odling av svampstammar isolerade från kliniska prover. RPMI-agar är inte avsett för mikrobiell isolering direkt från kliniska prover.

8- TESTFÖRFARANDE

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

Riktlinjer för beredning av inokulum:

Inokulum för jäst: suspension i saltlösning till 0,5 McFarland för *Candida* spp. och 1 McFarland för *C. neoformans*.

Inokulum för mögel: suspension av både konidier och hyfer (mogen tillväxt 5–7 dagar) i saltlösning med Tween till 0,5 McFarland för *Aspergillus* spp. och 1 McFarland för *Fusarium* och *Rhizopus* spp.

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

Inokulera hela plattans yta jämnt med bomullspinnen och se till att det inte finns några mellanrum mellan strecken. Doppa pinnen igen och inokulera en andra gång. Plattorna kan inokuleras antingen genom att svabba i tre riktningar eller genom att använda en automatisk plattrotator.

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 hämningzoner.





Riktlinjer för inkubation:

Jäst: 35 °C i luft i 24–48 timmar för *Candida* spp. och 48–72 timmar för *C. neoformans*.

Aspergillus spp.: 35 °C i 18–24 timmar; *Fusarium* spp.: 35 °C/24–48 timmar, följt av rumstemperatur i 24–48 timmar; *Rhizopus* spp.: 35 °C i 18–24 timmar

För andra arter, förläng inkubationstiden efter behov, inspektera plattorna dagligen för att se om det bildas en läsbar hämningsellips.

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

9 – AVLÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation, läs av plattorna från framsidan med locket borttaget och med reflekterat ljus.

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

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

Kontrollera att hämningszonerna för kvalitetskontrollstammen ligger inom acceptabelt intervall.

Bestämningen av MIC sker vid den punkt där den nedre delen av bakterietillväxtellipsen skär det motsvarande numret på testremsan. För specifika avläsnings- och tolkningsinstruktioner, se bipacksedeln från tillverkaren av gradientremsorna.

10 – ANVÄNDARKVALITETSKONTROLL

Alla tillverkade partier av RPMI-agarplattor släpps för försäljning efter att kvalitetskontroll har utförts för att kontrollera att specifikationerna uppfylls. Det är dock slutanvändarens ansvar att utföra kvalitetskontrolltester i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskrav och laboratoriets erfarenhet. För testning av QC-organismer finns detaljerade beskrivningar i bipacksedeln från tillverkaren av remsorna. Minst en QC-stam bör testas för att säkerställa att produkten fungerar korrekt. Stam och gradientremsor som är användbara för kvalitetskontroll: *C.parapsilosis* ATCC 22019 / amfotericin B, vorikonazol. Se tolkningsriktlinjerna i bruksanvisningen från tillverkaren av antifungala gradientremsor.

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 RPMI-agarplattor med hjälp av antimikrobiell känslighetstestning. AST utförs enligt gradientremsornas tillverkares IFU med följande stammar och antimykotiska gradientremsor: *C.krusei* ATCC 6258, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.albicans* ATCC 90028/amfotericin B och vorikonazol gradientremsor.

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

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; strikt efterlevnad av det protokoll som föreslås av tillverkaren av gradientremsorna krävs för att säkerställa tillförlitliga resultat.
- Avläsning och tolkning kräver expertis och noggrann efterlevnad av gradientremsornas tillverkares instruktioner. Problem kan uppstå när oerfarna avläsare felaktigt tolkar svag bakgrundstillväxt av små kolonier inom zonerna som resistens.¹²
- Överensstämmelsen mellan gradientremsor och referens-MIC-medium kan vara beroende av art, läkemedel och medium.^{13,14}
- 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

- RPMI Agar är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt medel, endast avsett för professionellt bruk. Det ska användas av adekvat utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal som iakttar godkända försiktighetsåtgärder mot biologiska risker och aseptiska tekniker.
- RPMI Agar är inte klassificerat som farligt enligt gällande europeisk lagstiftning.
- 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 farligt avfall före bortskaffande. 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 såsom odlingsmedium eller mikrobiella agens.
- Analyscertifikaten och säkerhetsdatabladet finns tillgängliga på webbplatsen www.biolifeitaliana.it.
- 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 samlats in från mänskliga och djuriska organiska distrikt, för miljöprover och för produkter avsedda för mänsklig eller animalisk konsumtion. Vår information befriar inte våra kunder från deras ansvar att kontrollera att vår produkt är lämplig för det avsedda ändamålet.

14 - FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Vid mottagandet ska plattorna förvaras i sin originalförpackning vid 2–8 °C och skyddas från direkt ljus. Om de förvaras på rätt sätt 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 sprickor i mediet, atypisk färg, överdriven fuktighet).



**15 - REFERENSER**

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. 2008.
2. Arendrup MC *et al.* EUCAST definitive document E.7.3.2 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Valid from 22 April, 2020.
3. Guinea J *et al.* How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. Clin Microbiol Infect 2019; 25(6):681-687.
4. Arendrup MC *et al.* How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by *Trichophyton*. Clin Microbiol Infect 2021;27(1):55-60.
5. Ranque SL, Lachaud LM, Gari-oussaint L, Michel-Nguyen A, Mallié M, Gaudart J, Bertout S. Interlaboratory Reproducibility of Etest Amphotericin B and Caspofungin Yeast Susceptibility Testing and Comparison with the CLSI Method. J Clin Microbiol 2012; 50(7): 2305–2309. .
6. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. JAMA 1967; 199 (8): 519–524
7. Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of Etest method for determining caspofungin (MK-0991) susceptibilities of 726 clinical isolates of *Candida* species. J Clin Microbiol 2001;39 (12):4387-9.
8. Espinel-Ingroff A .. Etest for antifungal susceptibility testing of yeasts. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;19(4):217-20
9. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Mills K, Bolmström A, Jones RN. Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. J Clin Microbiol . 2000;38(10):3715-7.
10. Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Evaluation of Etest Method for Determining Voriconazole and Amphotericin B MICs for 162 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 97–99.
11. Jong Hee Shin JH *et al.* Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2012;50(6):1852-5.
12. Johnson EM, Cavling-Arendrup M. Susceptibility Test Methods: Yeasts and Filamentous Fungi. In: Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
13. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, Updike CL, Clary CJ. Anidulafungin and micafungin MIC breakpoints are superior to that of caspofungin for identifying FKS mutant *Candida glabrata* strains and echinocandin resistance. Antimicrob Agents Chemoter 57:6361-6365
14. Axner-Elings M, Botero-Kleiven S, Jensen RH, Arendrup MC. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* isolates collected during 1-year period in Sweden. J Clin Microbiol 2011; 49:2516-2521.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF Katalognummer	eller REF	LOT Batchkod	IVD In vitro- diagnostisk medicinteknisk produkt	Tillverkare	Används av
Temperaturbegränsning	Innehåll som räcker till <n> tester	Se bruksanvisningen	Endast för engångsbruk	Ömtåligt, hantera med försiktighet	

REVISIONSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringar	Datum
Bruksanvisning (IFU) – Revision 1	Uppdaterad layout och innehåll i enlighet med IVDR 2017/746	2021/01
Revision 2	Borttagning av föråldrad klassificering	2023/04

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

