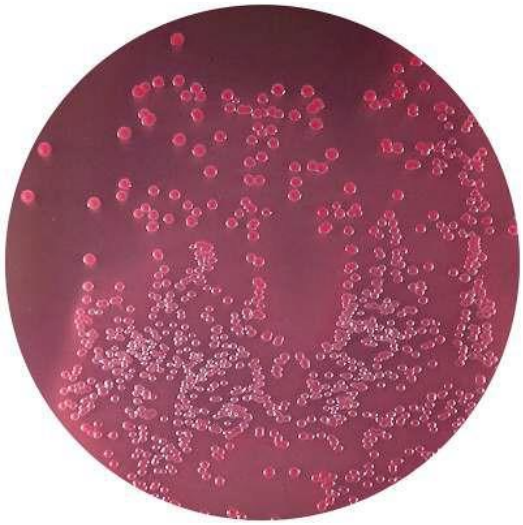
BRUKSANVISNINGAR

CIN AGAR BASE
YERSINIA SELEKTIVT TILLÄGG

Dehydratiserat odlingsmedium och selektivt tillägg



Yersinia enterocolitica på CIN-agar.

1 - AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. Selektivt och differentiellt basmedium och selektivt tillägg för isolering och karakterisering av *Y. enterocolitica* från kliniska och andra prover.

2 - SAMMANSÄTTNING CIN AGAR BASE

TYPISK FORMEL (EFTER REKONSTITUERING MED 1 LITER VATTEN) *

Pepton	20.000 g
Jästextrakt	2.000 g
Mannitol	20.000 g
Natriumpyruvat	2.000 g
Natriumklorid	1.000 g
Magnesiumsulfat	0.010 g
Natriumdesoxycholat	0.500 g
Irgasan	0.004 g
Neutralt rött	0.030 g
Kristallviolett	0.001 g
Agar	12.000 g

*Formeln får justeras och/eller kompletteras för att uppfylla de nödvändiga kriterierna för prestationer.

YERSINIA SELEKTIVT TILLÄGG (INNEHÅLLET I FLASKAN FÖR 500 ML MEDIUM)

Cefsulodin	7.50 mg
Novobiocin	1,25 mg

3 - METODPRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Släktet *Yersinia* omfattar 20 arter, av vilka endast *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* och vissa stammar av *Y.enterocolitica* är av patogen betydelse för människor, medan de andra arterna är av miljöbetingad natur. Av dessa arter är *Y. enterocolitica* den viktigaste som orsak till livsmedelsburna sjukdomar. *Y.enterocolitica* är en gramnegativ bacill som är rörlig vid en temperatur på 22-29 °C men som inte är rörlig vid 37 °C. Den vanligaste sjukdomsformen på grund av *Y.enterocolitica* är gastroenterit i samband med konsumtion av kontaminerade livsmedel eller vatten.[1] *Y. enterocolitica* är en heterogen grupp av stammar som traditionellt klassificeras genom biotypning i sex biogrupper på grundval av fenotypiska egenskaper och genom serotypning i mer än 57 O-serogrupper på grundval av deras O-ytantigen (lipopolysackarid eller LPS). Av de sex biotyperna anses fem vara patogena (1B, 2-5). Den viktigaste serogruppen av *Y.enterocolitica* i många europeiska länder är serogrupp O:3 följt av O:9, medan serogrupp O:8 främst påträffas i USA.[2] Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) Agar, som ursprungligen utvecklades 1979 av Schiemann,[3] är ett selektivt och differentiellt medium för isolering och karakterisering av *Y. enterocolitica* från kliniska[1,2] och icke-kliniska prover[4,5] . Mediet rekommenderas av ISO 10273[4] och av FDA-BAM[5] för påvisande av *Y. enterocolitica* i livsmedel.
Jämfört med MacConkey-agar, CAL-agar och Y-medium har CIN-agar visat sig vara det mest effektiva mediet för återvinning av *Y.enterocolitica* och hämmar nästan helt och hållet den fekala floran, samtidigt som den frodiga tillväxten av *Y.enterocolitica* främjas.[6]
Mediet är mycket selektivt: Schiemann[6] och Devenish[7] rapporterade att endast vissa stammar av *C.freundii, S.liquefaciens* och *E.agglomerans* växer på CIN-agar; kolonierna av dessa kontaminanter har ett utseende som liknar *Y.enterocolitica*.
Pepton och jästextrakt ger näring för bakterietillväxt. Grampositiva och vissa gramnegativa bakterier (t.ex. *E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, P. aeruginosa*) hämmas av de selektiva ämnen som finns i mediebasen (natriumdeoxycholat, kristallviolett, irgasan) och i det lyofiliserade tillskottet (cefsulodin och novobiocin). Mannitol finns som en jäsbar kolhydrat: Mannitoljäsande bakterier orsakar försurning av mediet med utfällning av deoxycholat och absorption av neutralt rött; *Y. enterocolitica* odlas därför med det karakteristiska utseendet av "bull's eye"-kolonier: koloniens centrum är djupt rött med en genomskinlig marginal. Organismer som inte metaboliserar mannitol till sura slutprodukter bildar färglösa kolonier.

4- ANVISNINGAR FÖR MEDIUMBEREDNING

Suspendera 28,75 g i 500 ml kallt renat vatten. Värm till kokande under ständig omrörning och sterilisera genom autoklavering vid 121 °C i 15 minuter. Kyl ner till 47-50 °C och tillsätt innehållet i en flaska Yersinia Selective Supplement rekonstituerad med 5 ml sterilt renat vatten under aseptiska förhållanden. Blanda väl och häll upp i sterila petriskålar.

5 - FYSISKA EGENSKAPER

CIN Agar Base	
Utseende av uttorkat medium	Rosa-beige, fint, homogent, fritt flytande pulver
Lösning och preparerade plattor utseende	rödviolett, klar
Slutligt pH vid 20-25 °C	7.4 ± 0.2
Yersinia selektivt tillägg	
Frystorkat tilläggsutseende	kort, tät, vit pastille
Utseende av rekonstituerat tillskott	klar, färglös

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano, Italien. Tel. +39 02 25209.1, fax +39 02 2576428
E-post: export@biolifeitaliana.it; webb: www.biolifeitaliana.it

6 - TILLHANDAHÅLLET MATERIAL - FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
CIN Agar Base	Dehydratiserat medium	4013022	500 g (8,7 L) CND: W010401010101; EDMA:14.01.01.01.01; RDM: 1858137 /R
Yersinia selektivt tillägg	Frystorkat tillskott	4240011	10 flaskor, var och en för 500 ml medium. CND: W0104010104; EDMA: 14.01.01.01.04; RDM: 1892760/R

7 - MATERIAL KRÄVS MEN TILLHANDAHÅLLS INTE

Autoklav, vattenbad, inkubator och laboratorieutrustning enligt behov, sterila slingor och svabbar, petriskålar, Erlenmeyerkolvar, kompletterande odlingsmedier och reagenser för identifiering av kolonierna.

8 - EXEMPLAR

CIN Agar är avsedd för bakteriologisk behandling av kliniska prover, t.ex. avföring och rektalsvabbar[1,2] och icke-kliniska prover, t.ex. livsmedel och djurfoder[4,5] . God laboratoriepraxis för insamling, transport och förvaring av kliniska prover bör tillämpas.[8] Samla in prover före antimikrobiell behandling om möjligt. Se lämpliga standardmetoder för detaljer om insamling och beredning av livsmedelsprov.[4,5]

9 - TESTFÖRFARANDE

Låt plattorna nå rumstemperatur och låta mediets yta torka.

Kliniska prover

Inokulera och streama provet med en slinga över plattans fyra kvadranter för att få väl isolerade kolonier, och se till att sektionerna 1 och 4 inte överlappar varandra. Alternativt, om materialet odlas direkt från en svabb, kan du rulla svabben över ett litet område av ytan vid kanten och sedan streama från detta inokulerade område.

Fekalier kan spädas 1:4 i steril koksaltlösning eller 0,1 % peptonvatten. Det har visat sig att utspädning avsevärt minskar mängden konkurrerande flora utan att äventyra isoleringen av ett lågt antal patogener.[2]

Inkubera aerobt vid 28-30 °C i 24-48 timmar.[2]

Prover från livsmedelskedjan[4]

Det allmänna förfarandet innebär att:

- Direkt utläggning av provsuspensionen i PSB-buljong* på CIN-agarplatta och inkubation vid 30 °C ± 1 °C i 24 timmar ± 2 timmar, eller
- Anrikning i PSB-broth och i ITC-broth** med inkubation vid 25 °C ± 1 °C i 44 timmar ± 4, följt av alkalisk behandling av kulturerna (0,5 mL kultur + 4,5 mL KOH 0,5 % i saltlösning i 20 s ± 5 s) och utläggning på CIN-agar (inkubation vid 30 °C ± 1 °C i 24 timmar ± 2 timmar).
- Användaren kan välja ett andra utläggningsmedium (t.ex. kromogen Yersinia Agar)***.

Anteckningar

* Yersinia PSB Broth (REF 402270). ** Yersinia ITC Broth Base REF 402265 tillsatt med tillägg av kaliumklorat (REF 4240065) och antimikrobiellt tillägg av Ticarcillin Irgasan (REF 4240060). *** Chromogenic Yersinia Agar Base (REF 408050) tillsatt med Chromogenic Yersinia Supplement (REF 4240095).

10 - LÄSNING OCH TOLKNING

Efter inkubation, observera bakterietillväxten och registrera koloniernas specifika morfologiska och kromatiska egenskaper.

Y.enterocolitica fermenterar mannitol och utvecklar kolonier med djupröda centra med skarpa gränser (oregelbundna eller hela), omgivna av en yttre zon som vanligen är genomskinlig (" bull's eye"-kolonier). Kolonistorlek, jämnhet och förhållandet mellan kant- och centrumdiametern varierar avsevärt mellan serotyperna.

Mannitol som inte fermenterar växer med färglösa eller blekgula kolonier.

Tillväxten av andra organismer än Yersinia-organismer hämmas tydligt eller helt.

11 - ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL.

Alla tillverkade partier av produkten släpps till försäljning efter att kvalitetskontrollen har utförts för att kontrollera att specifikationerna följs. Det är dock slutanvändarens ansvar att utföra kvalitetskontrollprovning i enlighet med lokala tillämpliga bestämmelser, i enlighet med ackrediteringskraven och laboratoriets erfarenhet. Nedan listas några teststammar som är användbara för kvalitetskontrollen.[9]

KONTROLLSTAMMAR		INKUBATION T°/ T / ATM	FÖRVÄNTADE RESULTAT
Y.enterocolitica	ATCC 9610	28-30°C / 18-24H / A	god tillväxt, kolonier med röd mitt
P.aeruginosa	ATCC 27853	28-30°C / 44-48H / A	hämmade eller delvis hämmade, färglösa kolonier
E.coli	ATCC 25922	28-30°C / 44-48H / A	hämmade
E.faecalis	ATCC 19433	28-30°C / 44-48H / A	hämmade

A: aerob inkubation; ATCC är ett varumärke för American Type Culture Collection.

12 - EGENSKAPER FÖR PRESTATIONER

Innan produkten släpps ut till försäljning testas ett representativt urval av alla partier av dehydrerad CIN Agar Base, kompletterad med Yersinia Selective Supplement, med avseende på produktivitet och selektivitet genom att resultaten jämförs med tidigare godkända referensbatcher.

Produktiviteten testas genom ett kvantitativt test med målstammen *Y.enterocolitica* ATCC 23715. Plattorna inokuleras med decimalutspädningar i saltlösning av kolonisuspensionerna och inkuberas aerobt vid 29-31 °C i 18-24 timmar. Kolonierna räknas på testpartiet (TB) och referenspartiet (RB) och produktivitetsförhållandet (*Pr=CFUTB/CFURB*) beräknas. Om *Pr* är ≥ 0,7 och om kolonierna uppvisar typiska egenskaper ("bull's eye"-kolonier) anses resultaten vara acceptabla och överensstämma med specifikationerna.

Dessutom testas produktivitetsegenskaperna med hjälp av semikvantitativ ekometrisk teknik med följande målstammar *Y.enterocolitica* DSM 13030 och *Y.enterocolitica* ATCC 9610. Mängden och de typiska egenskaperna hos tillväxten efter inkubation utvärderas och ska vara jämförbara i båda satser.

Selektiviteten utvärderas med den modifierade Miles-Misra-metoden genom att inokulera plattorna med lämpliga decimalutspädningar i saltlösning av en 0,5 McFarland-suspension av icke-målstammarna *S.marcescens* ATCC 8100, *E.coli* ATCC 8739, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 25923 och *E.faecalis* ATCC 29212. *S.marcescens* hämmas delvis, medan tillväxten av andra icke-målstammar hämmas helt vid utspädning 10^{-1}.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano,
Italien. Tel. +39 02 25209.1, fax +39 02 2576428
E-post: export@biolifeitaliana.it; webb:
www.biolifeitaliana.it

13 - METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Vid tät tillväxt av bakgrundsflora på CIN-plattorna kan kolonistorleken hos patogena *Y. enterocolitica* vara mindre och det typiska röda centret kan vara oklart eller saknas.[4]
- *Y.intermedia, Y.frederiksenii och Y.kristensenii* växer lika bra som *Y.enterocolitica* på CIN-agar och uppvisar samma koloni-morfologi.[10]
- *Serratia, Enterobacter* och *Citrobacter* hämmas svagt. *Serratia* och *Enterobacter* utvecklar upphöjda och slemmiga kolonier med en diffus rosa pigmentering, även om de ibland kan förväxlas med kolonier av *Y. enterocolitica*. Citrobacter-kolonier är de som ligger närmast *Yersinia* och kan inte särskiljas enbart genom sina morfologiska egenskaper.[10]
- Majoriteten av *Y.* pseudotuberculosis-stammarna hämmas av koncentrationen 15 mg/L cefsulodin.[11]
- Vissa stammar av *Y.enterocolitica* serovar O3 växer inte på CIN Agar.[11]
- Även om de mikrobiella kolonierna på plattorna kan särskiljas på grundval av sina morfologiska och kromatiska egenskaper rekommenderas att biokemiska, immunologiska, molekylära eller masspektrometriska tester utförs på isolaten från renodlade kulturer för fullständig identifiering. Om det är relevant, utför testning av antimikrobiell känslighet.
- Odlingsmediet och tillägget är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos av infektionssjukdomar; tolkningen av resultaten måste göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

14 - FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- Mediumbasen och tillägget är kvalitativ *in* vitro-diagnostik, endast för yrkesmässig användning; de ska användas av tillräckligt utbildad och kvalificerad laboratoriepersonal, som iakttar godkända försiktighetsåtgärder för biologiska risker och aseptiska tekniker.
- Mediumbasen och tillägget ska användas tillsammans i enlighet med de beskrivna anvisningarna.
- Dehydrerade medier och antibiotikainnehållande kosttillskott måste hanteras med lämpligt skydd. Före användning bör du ta del av säkerhetsdatabladen.
- Detta kulturmedium innehåller råvaror av animaliskt ursprung. Kontrollerna *före* och *efter slakt* av djuren och kontrollerna under råvarornas produktions- och distributionscykel kan inte helt och hållet garantera att produkten inte innehåller några överförbara patogener. Det rekommenderas därför att kulturmediet behandlas som potentiellt smittsamt och hanteras med iakttagande av de vanliga särskilda försiktighetsåtgärderna: inte inta, inandas eller låta det komma i kontakt med hud, ögon eller slemhinnor. Ladda ner TSE-utlåtandet 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 tillverkningspraxis i produktionsprocessen för preparerade medier.
- Alla laboratorieprover bör betraktas som smittsamma.
- Laboratorieområdet måste kontrolleras för att undvika föroreningar såsom pulver och tillägg till medium eller mikrobiella agenser.
- Sterilisera allt biofarligt avfall före bortskaffande. Kassera oanvänt medium och tillägg samt inokulerade plattor med prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lokal lagstiftning.
- Använd inte odlingsmediet och tilläggen som aktiva ingredienser i farmaceutiska preparat eller som produktionsmaterial avsedda att användas av människor eller djur.
- Analysintyg och säkerhetsdatablad finns 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 skyldighet eller ansvar. I samtliga fall måste befintliga lokala lagar, förordningar och standardförfaranden följas vid undersökning av prover som samlats in från organiska distrikt för människor och djur, för miljöprover och för produkter som är avsedda att konsumeras 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

Dehydratiserat medium

Efter mottagandet ska den förvaras vid +10 °C/+30 °C, borta från direkt ljus och på ett torrt ställe. Om den förvaras på rätt sätt kan den användas fram till utgångsdatumet. Använd inte 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, eller om behållaren är dåligt stängd, eller om det finns en uppenbar försämring av pulvret (färgförändringar, härdning, stora klumpar.

Selektivt tillägg

Förvara produkten i originalförpackningen vid +2°C/+8°C, bort från direkt ljus, när du har mottagit den. Om produkten förvaras på rätt sätt kan den användas fram till det utgångsdatum som anges på etiketten; använd inte produkten efter detta datum. När injektionsflaskan har öppnats och den lyofiliserade produkten har rekonstituerats ska den resulterande lösningen användas omedelbart. Före användning ska den lyofiliserade och rekonstituerade produkten undersökas och kasseras om det finns uppenbara tecken på försämring (t.ex. kontaminering, atypisk färg eller andra onormala egenskaper).

Användaren är ansvarig för tillverkning och kvalitetskontroll av de beredda medierna och för valideringen av deras hållbarhet, beroende på typ (plattor/rör/flaskor) och de tillämpade lagringsförhållandena (temperatur och förpackning).

16 - REFERENSER

1. Petersen MJ, Gladney LM, Schriefer ME. Yersinia. *I* Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. redaktörer. Manual of clinical microbiology,11th ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 2015.
2. Folkhälsa England. Undersökningar av avföringsprov för enteriska patogener. UK Standards for Microbiology Investigations (brittiska standarder för mikrobiologiska undersökningar). 2014. B 30 Issue 8.1.
3. Schiemann D A. Syntes av ett selektivt agarmedium för Yersinia enterocolitica. Can J Microbiol 1979; 25(11):1298-1304,
4. ISO 10273:2017 Mikrobiologi i livsmedelskedjan -- Horisontell metod för detektion av patogen Yersinia enterocolitica
5. USA:s livsmedels- och läkemedelsmyndighet. Bacteriological Analytical Manual (BAM) kapitel 8: Yersinia enterocolitica. Rev 10/2017
6. Head CB, Whitty DH, Ratnam S. Jämförande studie av selektiva medier för återvinning av Yersinia enterocolitica. J Clin Microbiol 1982;16:615.
7. Schiemann DA. Utveckling av ett tvåstegs anrikningsförfarande för återvinning av Yersinia enterocolitica från livsmedel. Appl Environ Microbiol 1982; 43 :14-27
8. Devenish JA, Schiemann DA. Ett förkortat schema för identifiering av Yersinia enterocolitica isolerad från livsmedelsberikningar på CIN-agar (cefsulodin-irgasan-novobiocin). Can J Microbiol1981; 27: 937-941.
9. CLSI (tidigare NCCLS) Kvalitetskontroll av kommersiellt framställda odlingsmedier. Godkänd standard, tredje upplagan. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
10. MacFaddin JF. Medier för isolering, odling, identifiering och underhåll av medicinska bakterier. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano,
Italien. Tel. +39 02 25209.1, fax +39 02 2576428
E-post: export@biolifeitaliana.it; webb:
www.biolifeitaliana.it

11. Fukushima H. Gomyoda M. Growth of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica Biotype 3B Serotype 03 Inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar. J Clin Microbiol 1986, 24:116-120.

4240011 YERSINIA SELEKTIVT TILLÄGG

SDS rev 7
Förordning (EU) 2020/878

Blandning med farliga beståndsdelar: cefsulodinnatrium och novobiocin.

Klassificering

Ögonirritation, kategori 2	H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
Hudirritation, kategori 2	H315	Orsakar hudirritation.
Känslighet vid andning, kategori 1 svårigheter vid inandning.	H334	Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andning
Hudkänslighet, kategori 1	H317	Kan orsaka en allergisk hudreaktion.

Märkning
Piktogram



Signalord Varning
Faroangivelser:
H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.
H315 Orsakar hudirritation.
H334 Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. H317 Kan orsaka en allergisk hudreaktion.

Försiktighetsföreskrifter:
P261 Undvik att andas in damm / rök / gas / dimma / ångor / spray. P280 Bär skyddshandskar / ögonskydd / ansiktsskydd.
P342+P311 Vid symtom på andningsbesvär: Ring en giftcentral / läkare / . . . P304+P340 VID INANDNING: För bort personen till frisk luft och gör det bekvämt att andas. P333+P313 Om hudirritation eller utslag uppstår: Få medicinsk rådgivning / uppmärksamhet.
P337+P313 Om ögonirritation kvarstår: Kontakta läkare.

TABELL ÖVER TILLÄMPLIGA SYMBOLER

REF eller **REF** Katalognummer	LOT Kod för partie	IVD *In vitro* Medicinsk diagnostik Enhet	Tillverkare	Den här sidan uppåt	Förvaras på en torr plats
Temperaturbegränsning	Innehåll som är tillräckligt för att <n> tester	Rådfråga bruksanvisningar	Användning av	Bräcklig	Håll dig borta från direkt ljus

REVIDERINGSHISTORIK

Version	Beskrivning av ändringarna	Datum
Revidering 1	Uppdaterad layout och innehåll	2020/09
Revidering 2	Ändring av "försiktighetsåtgärder och varningar" och "lagringsförhållanden och hållbarhet".	2022/01

Observera: Mindre typografiska, grammatiska och formateringsändringar ingår inte i revideringshistoriken.

Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano, Italien. Tel. +39 02 25209.1, fax +39 02 2576428
E-post: export@biolifeitaliana.it; webb: www.biolifeitaliana.it